

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA FERNANDA TORRES

**ANÁLISE DO POTENCIAL CITOTÓXICO AGUDO DA BUPIVACAÍNA E
LEVOBUPIVACAÍNA (S75-R25) INCORPORADAS A MICROESFERAS SOBRE O
NERVO CIÁTICO DE RATOS**

**CURITIBA
2010**

MARIA FERNANDA TORRES

**ANÁLISE DO POTENCIAL CITOTÓXICO AGUDO DA BUPIVACAÍNA E
LEVOBUPIVACAÍNA (S75-R25) INCORPORADAS A MICROESFERAS SOBRE O
NERVO CIÁTICO DE RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Bernardo Tenório

**CURITIBA
2010**

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA FERNANDA TORRES

ANÁLISE DO POTENCIAL NEUROTÓXICO DA BUPIVACAÍNA E
LEVOBUPIVACAÍNA (S75-R25) INCORPORADAS A MICROESFERAS SOBRE
NERVO CIÁTICO DE RATOS

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora no Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Antônio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk
Departamento de Medicina Veterinária, UFPR.

Profª Drª. Célia Regina Franco
Departamento de Biologia Celular, UFPR.

Profª Drª. Dominguita Lühers Graça
Departamento de Patologia, UFSM.

Profª Drª. Elizabeth Tambara
Departamento de Ciências da Saúde, UFPR.

Prof. Dr. James Skinovsky
Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Positivo.

Curitiba, 19 de março de 2010.

Ao meu pai, pela herança mais preciosa, a educação (*in memoriam*).

À minha mãe, pelo exemplo de persistência e otimismo (*in memoriam*).

Ao meu marido João, pelo significado que dá à minha vida.

Ao meu irmão Daniel, pela amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Pedro Paulo Tanaka por ter compartilhado a sua idéia e liderado o grupo que iniciou este trabalho.

Ao Professor Sérgio Bernardo Tenório por ter aceitado a minha orientação após o afastamento do professor Pedro Tanaka durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dominguita Lühers Graça que ensinou muito além de histopatologia e representa um exemplo a ser seguido.

Ao Professor James Skinovsky pelo conselho que impulsionou o início deste trabalho e pela amizade sincera.

Ao Professor Felipe Paulino de Figueiredo Wouk cujo talento serve como inspiração e cujos ensinamentos fazem grande diferença na minha vida profissional.

À Professora Célia Regina Franco pelo tempo dedicado no processamento do material que seria desperdiçado se não houvesse a sua atenção.

À Vera Regina Fontana Pionteke pelo processamento dos nervos para a microscopia eletrônica.

À Rosângela Borges Freitas pela paciência e atenção durante todas as manhãs que passamos fotografando o material no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Ao Luiz Antônio Wambier pelos últimos cortes e fotografias da microscopia eletrônica.

À Ana Paula Camargo Martins e à Professora Lúcia Noronha do Laboratório de Patologia da PUC-PR pelo auxílio indispensável na histomorfometria.

Aos funcionários do Biotério da Universidade Positivo (Bruno, Cirlei, Dirce, Emilene, Jéssica, Lourdes e Vanderlei) cujo companheirismo foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Johann Guilherme Sasse e à Raphaella de Souza Dacas Bonatto do Centro de Apoio Pedagógico da Universidade Positivo pela assistência na elaboração desta tese.

Ao Rohnelt Oliveira pela colaboração recebida durante o curso.

Aos demais colegas que de uma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A dor desempenha uma função biológica essencial: é a resposta do organismo a uma agressão ou trauma. Entretanto, a dor incontrolada pode reduzir dramaticamente a qualidade de vida. Frente a isso, o desafio atual é buscar novos métodos de tratamento com o objetivo de produzir analgesia. O anestésico local (AL), seja por sua ação periférica ou central, proporciona excelente analgesia com menor consumo de opióides e redução de efeitos colaterais correlacionados. A duração do efeito dos AL pode ser ampliada pela sua incorporação aos sistemas de liberação prolongada como microesferas. No entanto, a possibilidade de que os sistemas de liberação prolongada de AL sejam neurotóxicos não tem recebido a devida atenção na literatura. Este estudo teve o objetivo de investigar os efeitos de microesferas de ácido polilático-co-glicólico puras, preenchidas com levobupivacaína (LVBP) ou com bupivacaína (BP), assim como os efeitos da LVBP livre disponível como Novabupí® 0,75% em nervo ciático de ratos Wistar. Os ratos foram divididos em quatro grupos de acordo com o tempo de avaliação (2, 4, 6 e 8 dias) e denominados conforme a solução injetada sobre o nervo ciático: Microesferas com LVBP (ML), Microesferas com BP (MB); Microesferas puras (M), e Levobupivacaína livre (LL). Nos cortes semifinos observou-se distribuição regular homogênea nas fibras de colágeno no endoneuro e nenhuma alteração degenerativa dos axônios ou das bainhas de mielina foi constatada. Nos cortes ultrafinos foram observados axônios mielinizados e fibras de Remak de aspecto normal com axoplasma apresentando distribuição homogênea de neurofilamentos e microtúbulos. A análise histomorfométrica dos axônios não revelou diferença significativa entre os diâmetros dos axônios dos grupos estudados. Em nenhum dos grupos foram observadas alterações histopatológicas dos axônios e da mielina indicando que não houve inflamação. Concluiu-se que, nas condições deste estudo, a aplicação aguda de microesferas com BP e LVBP em excesso enantiomérico de 50% sobre o nervo ciático de ratos Wistar não causa alterações neurotóxicas diretas.

Palavras-chave: Anestésico local. Bupivacaína. Levobupivacaína. Microscopia eletrônica. Neurotoxicidade.

ABSTRACT

Pain performs an essential biological role: it is the response of the organism to an aggression or trauma. Nevertheless, uncontrolled pain dramatically reduces the quality of life. Considering this, the search for new methods of treatment aiming to produce analgesia is a new challenge. Local anesthetic (LA), be it through peripheral or central action, provides excellent analgesia with lower opioid consumption and reduced correlated collateral effects. The duration of the effect of the LA can be extended by its incorporation to prolonged dispensing systems such as microspheres. Nonetheless, the possibility that AL prolonged dispensing systems might be neurotoxic has not received due attention in the literature. The current study investigates the effects of microspheres of pure polilactic-co-glycolic acid, filled with levobupivacaine (LVBP) or bupivacaine (BP), on sciatic nerves of Wistar rats, as well as the effects of free LVBP available as Novabupi® 0,75%. The rats were divided into four groups according to the evaluation time (2, 4, 6 and 8 days) and named according to the injected solution: Microspheres with LVBP (ML), Microspheres with BP (MB), pure Microspheres (M), and free Levobupivacaine (LL). In the semi-thin sections, a regular homogeneous distribution on the endoneurium collagen fibers could be seen, and no degenerative modification of the axons or myelin was observed. In the ultra-thin sections, myelinated axons and Remak fibers of normal aspect with the axoplasm presenting homogeneous distributed neurofilaments and microtubules were observed. Histomorphometric analysis of the axons did not show significant differences among the diameters of the axons of the studied groups. In none of the groups histopathological modifications of the axons and myelin were observed, indicating that there was neither degeneration nor inflammation. As a conclusion, under the conditions of this study, acute application of BP and LVBP microspheres in enantiomeric excess of 50% on sciatic nerves of Wistar rats does not induced direct neurotoxic changes.

Key-words: Local anesthetic. Bupivacaine. Levobupivacaina. Electronic microscopy. Neurotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	CORTE SEMIFINO DE FASCÍCULO DE NERVO CIÁTICO NORMAL DE CAMUNDONGO C57BL/6 CORADO PELO AZUL DE TOLUIDINA.....	24
FIGURA 2 -	ULTRAMICROGRAFIA ELETRÔNICA DE NERVO PERIFÉRICO NORMAL DE RATO WISTAR.....	24
FIGURA 3 -	CORTES SEMIFINOS CORADOS PELO AZUL DE TOLUIDINA DOS NERVOS CIÁTICOS DOS RATOS QUE RECEBERAM MICROESFERAS PURAS (GRUPO M).....	32
FIGURA 4 -	CORTES SEMIFINOS DOS NERVOS BLOQUEADOS COM MICROESFERAS CONTENDO LVBP (GRUPO ML).....	33
FIGURA 5 -	CORTES SEMIFINOS DOS NERVOS BLOQUEADOS COM MICROESFERAS CONTENDO BP (GRUPO MB).....	34
FIGURA 6 -	CORTES SEMIFINOS DOS NERVOS BLOQUEADOS COM L A 0,75%, EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE 50%, SEM VASOCONSTRITOR (GRUPO LL).....	35
FIGURA 7 -	NERVO CIÁTICO CONTROLE.....	36
FIGURA 8 -	ULTRAMICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DOS NERVOS CIÁTICOS DOS RATOS QUE RECEBERAM MICROESFERAS PURAS (GRUPO M).....	37
FIGURA 9 -	ULTRAMICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DOS NERVOS CIÁTICOS ANESTESIADOS COM MICROESFERAS CONTENDO LVBP (GRUPO ML).....	38
FIGURA 10 -	ULTRAMICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DOS NERVOS CIÁTICOS ANESTESIADOS COM MICROESFERAS CONTENDO BP (GRUPO MB).....	39
FIGURA 11 -	ULTRAMICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DOS NERVOS CIÁTICOS ANESTESIADOS COM L A 0,75%, EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE 50%, SEM VASOCONSTRITOR (GRUPO LL).....	40

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	RESULTADOS OBTIDOS NA HISTOMORFOMETRIA CONSIDERANDO O DIÂMETRO DE 100 AXÔNIOS POR NERVO CIÁTICO ANALISADO.....	42
GRÁFICO 2 -	DIÂMETROS MÍNIMO E MÁXIMO, MEDIANA E DESVIO PADRÃO DOS GRUPOS ML, LL, MB E M APÓS A ELIMINAÇÃO DOS REGISTROS OBTIDOS RATO 3 DO GRUPO M.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO DIÂMETRO MÉDIO DAS 100 MEDIÇÕES DOS AXÔNIOS DO NERVO CIÁTICO DOS RATOS DOS DIFERENTES GRUPOS.....	41
TABELA 2 - VALORES DE p DAS COMPARAÇÕES DOS GRUPOS DOIS A DOIS.....	43
TABELA 3 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS GRUPOS APÓS A EXCLUSÃO DA AMOSTRA 3 DO GRUPO M.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ALs	- Anestésicos locais
LVBP	- Levobupivacaína
BP	- Bupivacaína
AL	- Anestésico local
MO	- Microscopia óptica
ME	- Microscopia eletrônica
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
IASP	- International Association for the Study of Pain
PLGA	- Ácido poliláctico-co-glicólico
PLA	- Ácido poliláctico
μm	- Micrômetro
nm	- Nanômetro
g	- Grama
$^{\circ}\text{C}$	- Graus Celsius
mg	- Miligrama
ML	- Microesferas com Levobupivacaína
MB	- Microesferas com Bupivacaína
M	- Microesferas puras
LL	- Levobupivacaína livre
mm	- Milímetro
mL	- Mililitro
min	- Minuto
N	- Normal
h	- Hora
rpm	- Rotações por minuto
μL	- Microlitro
M	- Molar
KH_2PO_4	- Fosfato diidrogênio de potássio
H_3PO_4	- Ácido fosfórico
PO	- Pós-operatório
pH	- potencial do Hidrogênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 O FENÔMENO DA DOR.....	16
2.2 O PAPEL DO ANESTÉSICO LOCAL NO TRATAMENTO DA DOR.....	17
2.3 SISTEMAS DE TRANSPORTE CONTROLADO DE LIBERAÇÃO DE DROGAS	18
2.3.1 Lipossomas	18
2.3.2 Ciclodextrinas	19
2.3.3 Microesferas	20
2.3.4 Benefícios Terapêuticos	21
2.3.5 Desvantagens	22
2.4 NERVOS PERIFÉRICOS: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS, ULTRA- ESTRUTURAIS E MECANISMOS DE LESÃO NERVOSA.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA.....	27
3.1.1 Caracterização da Amostra da Pesquisa	27
3.2 BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO	29
3.3 ESTUDO HISTOLÓGICO DO NERVO CIÁTICO	29
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA HISTOMORFOMETRIA	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS CORTES SEMIFINOS.....	31
4.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS CORTES ULTRAFINOS	31
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA HISTOMORFOMETRIA DOS NERVOS CIÁTICOS BLOQUEADOS	42
5 DISCUSSÃO.....	46
5.1 A ESCOLHA DO MODELO	47
5.2 A ESCOLHA DO BIOMATERIAL DAS MICROESFERAS.....	48
5.3 A ESCOLHA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS.....	49
5.4 A ESCOLHA DO MÉTODO DE ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	50
5.5 TOXICIDADE SISTÊMICA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS	52
5.6 NEUROTOXICIDADE RELACIONADA À LIBERAÇÃO LENTA DO ANESTÉSICO LOCAL SOBRE NERVO PERIFÉRICO	53
5.7 POSSIBILIDADE DE FALHA TÉCNICA E INJEÇÃO INTRANEURAL	59
5.8 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	60
6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A dor pode ser eliminada ou minimizada se o estímulo nociceptivo aferente for impedido de alcançar o sistema nervoso central. O objetivo dos bloqueios de nervos periféricos é interromper os impulsos que partem do tecido lesado e percorrem os nervos periféricos antes de entrar na medula espinhal. Bloqueios de nervos periféricos fazem parte de uma técnica analgésica multimodal que oferece um efetivo controle da dor pós-operatória com efeitos colaterais mínimos (MURAUSKI; GONZALEZ, 2002).

O bloqueio regional induzido por anestésicos locais (ALs) deve ser aperfeiçoado pelo desenvolvimento de sistemas de liberação controlada capazes de prolongar o tempo da duração do seu efeito e a redução de sua absorção sistêmica (LE CORRE et al., 1994).

A levobupivacaína (LVBP) tem demonstrado menor toxicidade sistêmica em relação à bupivacaína (BP). Dessa forma, o emprego da LVBP em bloqueios nervosos promete oferecer menores riscos para as células nervosas e, portanto, o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada desse fármaco sobre troncos nervosos pode oferecer maior tempo de anestesia com mais segurança tanto do ponto de vista local quanto sistêmico.

A administração de AL diretamente sobre nervos ou troncos nervosos para bloquear a percepção da dor pelo paciente é uma técnica eficaz. No entanto, as implicações dessa administração com relação a danos estruturais das células nervosas têm sido pouco discutidas.

De acordo com KALICHMAN (1993), há mais de 50 anos sabe-se que os ALs podem causar danos em animais. Em sua revisão sobre os mecanismos fisiológicos da neurotoxicidade causada pelos ALs concluiu que danos aos nervos foram relacionados à inibição do transporte axonal, desestabilização do citoesqueleto axonal, degeneração axonal e isquemia neural. No entanto, poucos estudos descreveram o mecanismo responsável pela injúria e se a injúria é causada direta ou indiretamente pelo AL.

Tendo em vista a falta de informações a respeito da aplicação de microesferas sobre troncos nervosos, ROSE et al. (2005) sugeriram a realização de estudos a partir de injeções subcutâneas e infiltrações locais em feridas profundas antes da sua administração próxima ao neuroeixo. Assim sendo, o desenvolvimento

de estudos clínicos e toxicológicos deve anteceder a aceitação das microesferas na prática clínica.

A possibilidade de que os sistemas de liberação prolongada de AL sejam neurotóxicos não tem recebido a devida atenção na literatura. DYHRE et al. (2006) comprovaram que concentrações maiores de lidocaína e BP promovem bloqueio mais duradouro em nervos ciáticos de ratos, no entanto, são claramente neurotóxicas sob análise histopatológica. Esses resultados sugerem a existência de uma relação entre tempo prolongado de anestesia e lesão neurotóxica.

De acordo com PEREZ-CASTRO et al. (2009), muitas complicações neurológicas pós-operatórias são atribuídas à citotoxicidade dos ALs, no entanto, os mecanismos responsáveis pelos efeitos tóxicos sobre o metabolismo celular permanecem obscuros.

Estudos investigaram a farmacodinâmica e farmacocinética da intoxicação aguda provocada por ALs e, apesar de existirem relatos na literatura sobre neurotoxicidade provocada por eles, (KALICHMAN, 1993; KALICHMAN et al., 1993) não existem estudos experimentais *in vitro* ou *in vivo* sobre o uso de microesferas com LVBP, bem como da avaliação morfológica dos efeitos neurotóxicos desse anestésico por microscopia óptica (MO) ou eletrônica (ME).

Assim sendo, novos sistemas de liberação lenta de ALs podem ser desenvolvidos com o objetivo de prolongar o tempo de contato do AL com as células nervosas sem que a integridade destas seja ameaçada.

Este estudo faz parte de uma pesquisa ampla sobre a LVBP em excesso enantiomérico incorporada a microesferas que teve como objetivos: a avaliação clínica dos ratos submetidos ao bloqueio do nervo ciático por meio dos testes de nocicepção e propriocepção; a análise da concentração dos AL no plasma dos ratos por estudo farmacodinâmico; a investigação da relação entre o tempo de bloqueio nervoso com a concentração do AL no plasma dos ratos; e, como objetivo principal deste estudo, a análise morfológica ultraestrutural nos nervos ciáticos em busca de sinais de toxicidade local como edema, desmielinização e degeneração axonal.

A demonstração dos efeitos locais do sistema de liberação prolongada de LVBP em excesso enantiomérico de 50% administrado sobre nervos ciáticos de ratos Wistar poderá servir como base para a discussão dos riscos e dos benefícios desse novo método de bloqueio nervoso e como um referencial para o estudo do

efeito de outras moléculas quando administradas através de sistemas de liberação prolongada.

A fim de investigar a segurança dos sistemas de liberação lenta de ALs para a célula nervosa, estudos *in vivo* devem ser realizados para a determinação dos seus efeitos sobre a estrutura celular dos sistemas nervosos sensorial e motor. A avaliação da integridade celular por microscopia eletrônica de transmissão (MET) dará subsídios para correlacionar o tempo de anestesia com danos estruturais.

Este estudo teve o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos em nervo ciático de ratos Wistar das microesferas de ácido polilático-co-glicólico puras, preenchidas com LVBP e com BP, assim como da LVBP livre comercialmente disponível como Novabupi® 0,75% sem vasoconstritor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O FENÔMENO DA DOR

Há muito existe a preocupação em compreender o fenômeno da dor e, conseqüentemente, conceituá-lo. Segundo a *International Association for the Study of Pain* (IASP), esse fenômeno é caracterizado por uma experiência sensitiva e emocional desagradável, em que há percepção de um estímulo nocivo associado à lesão tecidual real ou potencial.

De acordo com a duração da lesão tecidual, pode-se classificar a dor em aguda ou crônica. A dor aguda é de curta duração e geralmente persiste apenas pelo período da lesão tecidual, é transportada pelas fibras A delta. Representa uma reação fisiológica natural do organismo. Já a dor crônica está associada a alterações mais profundas, é transportada pelas fibras C e torna-se evidente em estados patológicos persistentes como câncer e artrite reumatóide ou quando os mecanismos normais de cicatrização perdem função (SIDDALL; COUSINS, 1995).

A dor desempenha uma função biológica essencial: é a resposta do organismo a uma agressão ou trauma. Entretanto, em algumas situações, a dor incontrolada pode reduzir dramaticamente a qualidade de vida. Frente a isso, o desafio atual é buscar novos métodos de tratamento com o objetivo de produzir analgesia, isto é, aliviar ou eliminar a dor. Novos fármacos e os avanços na pesquisa básica e clínica têm ampliado as opções de tratamento da dor (SIDDALL; COUSINS, 1995).

Apesar de ser a resposta fisiológica do organismo a um determinado ou potencial trauma, a função biológica da dor pode ser substituída por uma consequência insuportável para o paciente. Por isso, o desenvolvimento de novos métodos de tratamento para produzir analgesia é um desafio (ARAÚJO et al, 2003).

2.2 O PAPEL DO ANESTÉSICO LOCAL NO TRATAMENTO DA DOR

Tradicionalmente, a dor é a maior preocupação de pacientes, familiares e profissionais da saúde. A utilização de AL para o bloqueio de nervos periféricos é uma intervenção eficaz que permite um controle efetivo da dor pós-operatória aguda e de algumas condições crônicas (MURAUSKI; GONZALEZ, 2002). O AL, seja por sua ação periférica ou sobre o neuroeixo, proporciona excelente analgesia com menor consumo de opióides e redução de efeitos colaterais correlacionados a esses últimos (BORGEAT; EKATODRAMIS; SCHENKER, 2003).

O bloqueio de um nervo periférico consiste em injeção de um AL próxima aos nervos anatomicamente relacionados com a área cirúrgica. O AL altera a permeabilidade da membrana celular aos íons sódio (Na^+), impedindo a geração e transmissão do impulso nervoso pelas fibras nervosas sensoriais ou motoras (MURAUSKI; GONZALEZ, 2002).

Bloqueios de nervos periféricos com AL proporcionam excelente alívio da dor. Entretanto, o seu efeito clínico no tratamento da dor aguda ou pós-operatória é limitado pela curta duração do seu efeito. Sendo assim, um AL capaz de produzir efeito por dias ou até semanas ainda deve ser desenvolvido (DYHRE et al., 2006).

As características desejáveis para uma molécula anestésica são: efeito prolongado, baixa toxicidade local e/ou sistêmica e aumento da seletividade para o bloqueio sensorial em relação ao bloqueio motor (DE JONG, 1994). Esses benefícios podem ser alcançados com a alteração de propriedades físicas e químicas na molécula dos AL. A liberação controlada desses fármacos é uma alternativa que, atualmente, promete oferecer a segurança e a analgesia esperadas.

Os efeitos dos ALs persistem por aproximadamente 6 horas quando aplicados subcutaneamente, e não mais do que 20 horas quando empregados em bloqueio de nervo periférico (MULROY; LARKIN; BATRA, 2001). Tentativas em prolongar o bloqueio através do uso de adjuvantes, do aumento da concentração ou volume do AL ou pela administração contínua por cateter controlado pelo paciente, apresentam benefícios limitados (NEAL; HEBL; GERANCHER, 2002).

A administração mais eficaz dos ALs pode ser obtida pela incorporação de sistemas de liberação prolongada como implantes (BLANCO; BERNARDO; GOMEZ, 1999), lipossomas (ARAÚJO; PINTO; BRAGA, 2003) complexação de drogas com

ciclodextrinas (ARAÚJO; FRACERTO; BRAGA, 2005) ou micropartículas (LE CORRE; LE GUEVELLO; GAJAN, 1994).

A BP é o AL pertencente à classe das amino-aminas mais utilizado em procedimentos cirúrgicos, principalmente para anestésias regionais prolongadas. Os efeitos adversos, tais como neurotoxicidade e cardiotoxicidade, associados ao uso de BP levaram à pesquisa de novos agentes com perfil de bloqueio semelhante, porém, menos cardiotóxicos. Surgiram, então, a ropivacaína e a LVBP, sintetizadas sob a forma enantiomérica S (-), demonstrando que, além de modificações moleculares, a estereosseletividade é fator importante para diminuir os efeitos colaterais adversos da BP (MATHER; CHANG, 2001).

2.3 SISTEMAS DE TRANSPORTE CONTROLADO DE LIBERAÇÃO DE DROGAS

2.3.1 Lipossomas

Os lipossomas são esferas microscópicas de tamanhos variados com uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por compartimentos aquosos, onde as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior e as cabeças polares para o exterior da bicamada, mantendo contato com a fase aquosa (RANADE, 1989).

De acordo com o número de bicamadas que constituem os lipossomas, estes são classificados em vesículas multilamelares ou unilamelares. O número de camadas e o método de preparação influenciam diretamente na absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e também no perfil toxicológico das drogas encapsuladas (LIENTENBERG; BARENHOLZ, 1988).

A estrutura de um lipossoma também pode ser multivesicular consistindo de camadas aquosas e lipídicas alternadamente. Consequentemente, essa organização permite a incorporação de drogas tanto hidrossolúveis quanto lipossolúveis. Devido à sua semelhança com as membranas biológicas, os lipossomas parecem apresentar menos antigenicidade e toxicidade (ROSE et al. 2005).

Lipossomas menores do que 120 nm atravessam rapidamente os capilares, enquanto que lipossomas maiores, com cerca de 200 nm ou mais, tendem a

permanecer no local de injeção (GRANT; BANSINATH, 2001). De maneira geral, pode-se dizer que o uso de drogas encapsuladas em lipossomas tem como vantagem a liberação lenta da droga, efeito prolongado e redução da toxicidade para os sistemas cardiovascular e nervoso central (LANGERMAN; GRANT; ZAKOWSKI, 1992).

Para ROSE et al. (2005), novos estudos sobre as propriedades neurotóxicas de lipossomas devem ser realizados para que se possa verificar se a hidrólise de fosfolípidos produz metabólitos tóxicos ao sistema nervoso central. Segundo LAFONT; LEGROS (1996) a administração intravenosa de lipossomas contendo BP pareceu ser menos neuro e cardiotoxica quando comparada à solução de BP livre. Além disso, os autores observaram que a BP a 0,25% encapsulada em lipossomas multilamelares, administrada através de cateter epidural, bloqueou a dor de um paciente humano com câncer de pulmão durante 11 horas. A completa analgesia se estendeu por mais 7 horas já que a analgesia produzida pela droga livre durou 4 horas.

2.3.2 Ciclodextrinas

As dextrinas são oligossacarídeos resultantes da hidrólise enzimática do amido. Alguns microrganismos e plantas produzem enzimas denominadas glicosiltransferases que são capazes de degradar o amido em produtos cíclicos denominados ciclodextrinas (MATIOLI, 2000; LOFTSSON; MASSON, 2001).

As β -ciclodextrinas são dextrinas cíclicas utilizadas para a complexação com várias classes de drogas, tais como agentes antitumorais, antidiabéticos e antiinflamatórios (DALMORA; DALMORA; OLIVEIRA, 2001), que podem ser administrados por diversas vias como subaracnóidea, venosa, muscular, peridural, oral, nasal e dérmica (IRIE; UEKAMA, 1997).

A habilidade das ciclodextrinas de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e da polaridade com a droga. Além disso, as forças que dirigem a complexação ciclodextrinas/drogas têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água na cavidade das ciclodextrinas, às interações de van der Waals, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (BIBBY; DAVIES; TUCKER, 2000; MATIOLI, 2000).

Além da estabilização, a modificação da farmacocinética e das propriedades biofarmacêuticas das drogas são os efeitos mais significantes da complexação com ciclodextrinas. Esses efeitos são observados especialmente na solubilidade e na liberação da droga complexada. Como consequência, a administração de fármacos complexados com β -ciclodextrina altera a intensidade e a duração de seus efeitos através da baixa absorção sistêmica das drogas (FROMMING; SZEJTLI, 1994). Essa propriedade das ciclodextrinas torna bastante promissor seu uso para a complexação com ALs.

2.3.3 Microesferas

As microesferas biodegradáveis têm se apresentado como uma alternativa para implante. Sua liberação lenta, com menor captação pela circulação sistêmica, evita altas concentrações plasmáticas do AL associado a elas. São formuladas a partir do método de evaporação em solvente, e o seu menor tamanho permite a injeção local por meio de agulha (MATHIOWITZ et al., 1988).

LE CORRE et al. (1994) prepararam microesferas utilizando a BP como droga a ser testada por via intraperitoneal e intratecal em coelhos. A caracterização das microesferas em MO e ME de varredura revelou microesferas esféricas com 1 a 5 μ m de diâmetro médio e sem evidências de agregação. Observou-se, também pela ME de varredura, que as microesferas possuem uma estrutura interna porosa que permite o influxo de líquido à medida que a droga se difunde para fora através de canais na sua parede.

A grande vantagem dos sistemas de micropartículas frente aos implantes é que, devido ao seu pequeno tamanho, podem ser injetadas com uma seringa convencional não necessitando de intervenção cirúrgica (SAEZ et al., 2004).

As microesferas utilizam como co-polímero o ácido polilático-co-glicólico (PLGA). Cada grama de co-polímero de PLGA pode conter até 0,8 g de BP (CASTILLO et al., 1996), diferentemente do polímero de ácido polilático (PLA) que pode conter somente 22% de AL, fato que em escala industrial pode tornar sua produção inviável (LE CORRE; LE GUEVELLO; GAJAN, 1994).

Microesferas de PLGA contendo LVBP em excesso enantiomérico de 50% liofilizadas após a eliminação do solvente por meio do método “spray-dried” foram

testadas *in vitro* com resultados semelhantes aos encontrados com a BP (TANAKA et al., 2008).

A BP incorporada a microesferas aumentou a duração do efeito antinociceptivo em ratos submetidos a dor inflamatória aguda pela injeção de carregenina na região plantar. Constatou-se, também, que a duração do efeito da BP é proporcional à dose incluída nas microesferas (ESTEBE et al., 1994; FLETCHER et al., 1997).

Estudos de ESTEBE et al. (2004) sobre bloqueios nervosos realizados em ratos, comprovaram que o tempo de duração da analgesia proporcionada pela BP em microesferas é significativamente prolongado. Observou-se analgesia por 2 horas nos bloqueios realizados com solução de 1,25 mg de BP, enquanto as microesferas contendo 12,5 mg de BP em suspensão com dexametasona proporcionaram um efeito de 21 horas.

2.3.4 Benefícios Terapêuticos

A utilização clínica de drogas administradas através de sistemas de liberação controlada apresenta benefícios terapêuticos desde que algumas características sejam controladas. As pesquisas com formulações de liberação controlada de ALs têm mostrado resultados promissores (DHYRE et al., 2006).

Estudos em pacientes demonstraram a aplicabilidade e eficácia da encapsulação de BP a 0,5 % em lipossomas por administração peridural e infiltração no plexo braquial para o tratamento da dor pós-cirúrgica e da dor crônica oncológica. Foi observada uma maior duração da analgesia e sua potencialização quando comparada àquela obtida após administração do AL livre. Esses resultados podem ser atribuídos à manutenção de altos níveis da droga no local de injeção (BOOGAERTS; LAFONT; DECLERQ, 1994; LAFONT; LEGROS; BOOGAERTS, 1996).

LE CORRE et al. (1995) demonstraram que a microencapsulação de BP levou à menor absorção da droga pela absorção sistêmica bem como ao efeito farmacodinâmico mais prolongado. Resultados semelhantes foram encontrados por ESTEBE et al. (1994) que, após a aplicação de microesferas com BP próximo ao nervo ciático de ratos, observaram que o efeito da droga aumentou

consideravelmente e que a sua concentração plasmática foi 5 vezes menor quando comparada à solução de BP livre.

Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento dessas formulações, estudos ainda são necessários para a determinação da razão de liberação e estabilidade dos anestésicos nas diversas preparações, bem como para o controle de alguns efeitos como indução de bloqueio simpático. Por isso, modificações nos métodos de preparação e/ou variações na composição têm sido utilizadas com o objetivo de aumentar a eficiência dos AL (FLETCHER; LE CORRE; GUILBAUD, 1997; GRANT; BARENHOLZ; PISKOUN, 2001).

Estudos sobre microesferas preenchidas com LVBP ainda não são encontrados na literatura em função do seu uso limitado aos laboratórios de experimentação. Microesferas com LVBP não estão disponíveis no mercado e, para este estudo, foram desenvolvidas e enviadas pelo laboratório de farmácia e biofarmácia da Universidade de Rennes, França.

2.3.5 Desvantagens

Poucos relatos sobre avaliação histopatológica de neurotoxicidade por ME são encontrados na literatura. UCHINO et al. (2005) avaliaram amostras de nervos de ratos submetidos a tratamento com cisplatina e cisplatina incorporada a micelas poliméricas e observaram que o grupo tratado com cisplatina livre mostrou alterações importantes descritas como: degeneração neuronal difusa indicada por perda de microtúbulos, perda de filamentos, degeneração do citoplasma de células de Schwann, e lamela interna irregular da bainha de mielina. Esses autores sugeriram uma ação menos tóxica da cisplatina quando incorporada às micelas pelo acúmulo menor de platina nos nervos.

De acordo com MURAUSKI; GONZALEZ (2002), a maior preocupação em relação ao uso dos ALs é a toxicidade sistêmica e, em segundo lugar, a lesão ao nervo periférico. Lesão nervosa associada ao bloqueio anestésico pode ser causada pela agulha ou por injeção intraneural, podendo resultar em neuropatia química permanente.

ESTEBE; MEYERS (2004) observaram efeito neurotóxico dose-dependente da amitriptilina aplicada no espaço extraneural. A neurotoxicidade foi evidenciada

por degeneração walleriana, o que sugeriu aos pesquisadores que essa lesão poderia ser, em parte, responsável pelo atraso da recuperação da função motora.

GERNER et al. (2005) relacionaram a recuperação da função nociceptiva com desmielinização mais pronunciada vista em MO. Esses autores observaram degeneração walleriana e desmielinização de fibras nervosas menores comprovando neurotoxicidade em amostras de nervos bloqueados com N-propildoxepina. No entanto, os pesquisadores relataram dificuldade para diferenciar fibras nervosas mielinizadas de não mielinizadas em MO sendo, portanto, recomendada investigação em ME.

Segundo MRAK (2002), a análise de tecidos por microscopia eletrônica é útil e, em alguns casos, essencial. Algumas lesões de nervos periféricos, como uma variedade de neuropatias tóxicas ou induzidas por drogas, requerem exame ultraestrutural. As alterações pesquisadas são as de degeneração axonal da mielina e das células de Schwann.

2.4 NERVOS PERIFÉRICOS: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS, ULTRA-ESTRUTURAIS E MECANISMOS DE LESÃO NERVOSA

Um nervo periférico é uma estrutura complexa que consiste de fascículos unidos pelo epineuro, uma bainha externa de tecido conjuntivo. Cada fascículo é envolvido individualmente pelo perineuro e contém várias fibras nervosas, mielinizadas ou não, e capilares sanguíneos associados a um tecido conjuntivo frouxo denominado endoneuro (FIGURA 1).

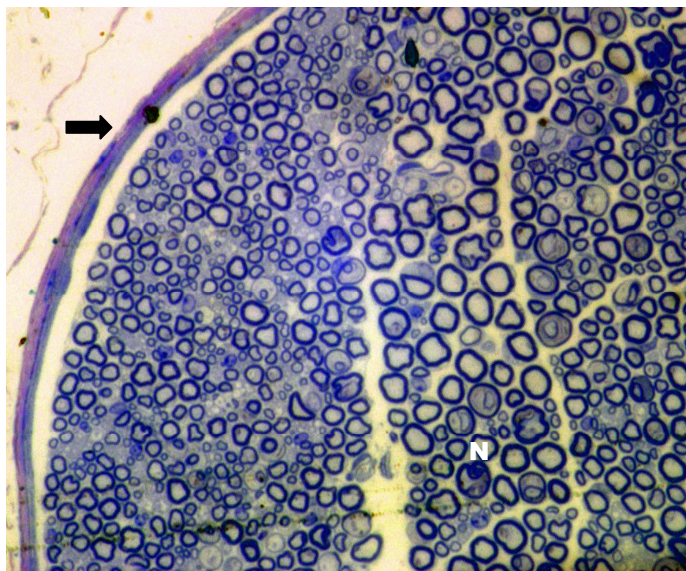


FIGURA 1 - Corte semifino de fascículo de nervo ciático normal de camundongo C57BL/6 corado pelo azul de toluidina.

FONTE: RAMOS (2007)

NOTA: Observam-se as fibras nervosas mielinizadas, núcleo de células de Schwann (N) e o perineuro (seta) que envolve o fascículo. Objetiva 40X.

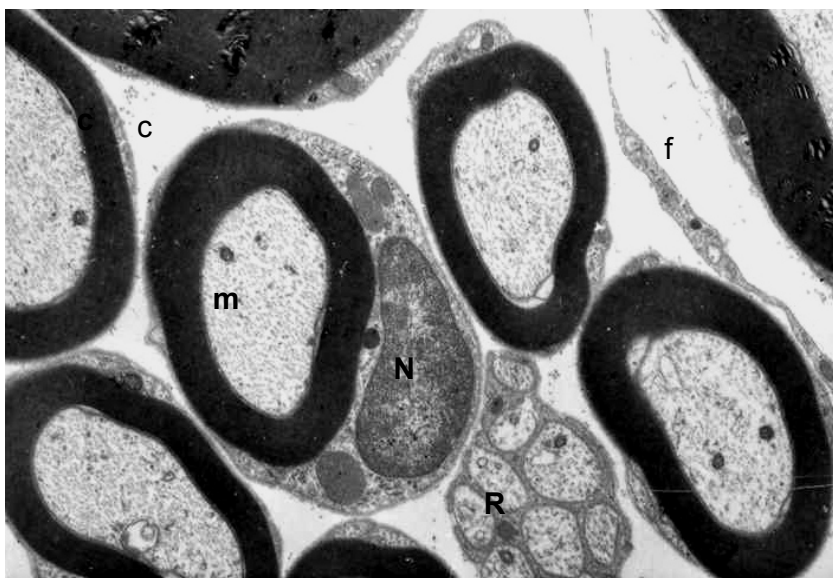


FIGURA 2 - Ultramicrografia eletrônica de nervo periférico normal de rato Wistar.

FONTE: TORRES (2000)

NOTA: São visualizadas axônios mielinizados (m), o núcleo de uma célula de Schwann (N) e uma fibra de Remak (R), fibras de colágeno (c) 7500X. As fibras mielinizadas e as de Remak estão imersas numa matriz colagênica na qual são observados processos de fibroblastos (f).

Cada fibra nervosa é envolvida por células de Schwann que produzem e mantêm um internodo de mielina nas fibras mielinizadas; grupos de fibras de pequeno diâmetro ($< 1 \mu\text{m}$) que não recebem mielina, mas são envolvidas por células de Schwann, constituem as chamadas fibras de Remak (FIGURA 2).

A mielina que envolve as fibras possui relações morfológicas constantes com o diâmetro axonal, em espessura, número de lamelas e volume de mielina que cobre o internodo. O processo de mielinização inicia durante o desenvolvimento e cada célula de Schwann está encarregada de produzir e sustentar um internodo, ocasionalmente dois (BONDAN et al., 1999).

O processo de desmielinização consiste na perda da mielina sem lesão axonal. A degeneração walleriana consiste na degeneração axonal e, conseqüentemente da mielina. Ambos os processos degenerativos desenvolvem-se com marcado influxo macrofágico (CAVANAGH, 1990).

As fibras nervosas dependem do ambiente endoneural estável para manutenção das suas funções, o que é diferente do meio intersticial extraneural. Nervos periféricos são ricamente vascularizados por uma extensa rede vascular na qual os capilares endoneurais têm células endoteliais unidas por junções oclusivas à semelhança das que formam a barreira hematoencefálica. O leito neurovascular é regulado pelo sistema nervoso simpático. Além disso, o transporte axonal de várias substâncias funcionalmente importantes depende do metabolismo oxidativo. Qualquer uma dessas estruturas ou funções pode ser afetada por uma agressão ao nervo com possível perda temporária ou permanente da função (ENNEKING et al., 2005).

Segundo JOHNSON et al. (2002), é improvável que o mecanismo responsável pela neurotoxicidade dos AL seja o seu efeito farmacológico primário. O bloqueio dos canais de sódio (Na^+) e a inatividade elétrica resultante deveriam reduzir o metabolismo neuronal e preservar ATP. No entanto, o efluxo de cálcio (Ca^{+2}) para o espaço extracelular depende diretamente do influxo de Na^+ através do antiporte $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{+2}$. Por isso, suspeita-se que a elevação prolongada dos níveis de Ca^{+2} no citoplasma seja responsável pela alteração da homeostase neuronal. Além desse efeito secundário ao bloqueio dos canais de Na^+ , os níveis citoplasmáticos de Ca^{+2} podem aumentar devido ao influxo a partir do líquido extracelular através da membrana plasmática. Apesar de não ter sido possível localizar a passagem dos

íons Ca^{+2} , os autores consideraram a hipótese de que, além de interagir com canais iônicos, os ALs sejam capazes de alterar a permeabilidade da bicamada lipídica.

Essa suposição foi reforçada por ESTEBE; MYERS (2004) quando demonstraram efeitos tóxicos da amitriptilina em nervo ciático de ratos. A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico também utilizado para o controle de dor neuropática mais potente do que a BP em função do bloqueio mais eficaz dos canais de Na^+ . Seu efeito parece estar relacionado com o bloqueio de canais de Na^+ , potássio (K^+) e Ca^{+2} ; além do bloqueio de receptores para serotonina e alfa-adrenérgicos. Ao aplicar a amitriptilina sobre nervo ciático de rato, observaram efeito neurotóxico dose-dependente que se manifestou como edema endoneural, axoplasma escuro indicativo de injúria axonal, desintegração das lamelas de mielina e fagocitose de fibras nervosas desintegradas por macrófagos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a redação deste trabalho foram seguidas as Normas para apresentação de documentos científicos da Universidade Federal do Paraná (2007).

3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

A população da pesquisa foi constituída por 16 ratos Wistar machos com, aproximadamente, 3 meses de idade e 300g de peso médio, provenientes do Biotério da Universidade Positivo. Durante todo o período de experimentação, os animais foram mantidos em sala climatizada (temperatura média de 22°C) com fotoperíodo de 12 horas com livre acesso a água e ração. O projeto deste estudo foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Positivo.

Os experimentos foram realizados em ambiente tranquilo e conduzidos pelo mesmo pesquisador que desconhecia a droga injetada.

3.1.1 Caracterização da Amostra da Pesquisa

3.1.1.1 Animais

Os ratos foram divididos em 4 grupos de 4 animais denominados de acordo com a solução injetada sobre o nervo ciático em: Microsfersas com Levobupivacaína (ML), Microesferas com Bupivacaína (MB); Microesferas puras (M), e Levobupivacaína livre (LL).

3.1.1.2 Microesferas

As microesferas com LVBP, BP, e as microesferas puras foram desenvolvidas no Laboratório de Farmácia e Biofarmácia da Universidade de

Rennes, França, pelo método *spray-dried* utilizando-se o co-polímero de ácido polilático-co-glicólico de acordo com a metodologia relatada por TANAKA et al. (2008) e descrita resumidamente a seguir.

A solução foi processada pelo método de *spray-dried* com uma Mini Büchi B-191 *spray-dried* laboratorial usando bico de 0,7 mm. Os parâmetros do processo foram assim definidos: temperatura de entrada (50°C); temperatura de saída (43°C); aspirador (100%); bomba (2,5 mL/min) e fluxo do spray (600 nL/h). As microesferas foram armazenadas sob vácuo à temperatura de 4°C até caracterização em relação ao seu tamanho e conteúdo. As microesferas foram dispersas em 5 mL de uma solução aquosa Tween 20 a 0,05%, ultracentrifugadas por 10 segundos e depois dispersas em 75 mL de água destilada. As amostras das microesferas foram dissolvidas em cloridrato de metileno (1 mL). A seguir, o fármaco foi extraído em 0,1 N ácido sulfúrico (5 mL) recoberto com etidocaína como controle interno. Após mexer (5 min) e centrifugar (3.000 rpm, 10 min), 20 µL da fase aquosa foram diluídos em 2 mL da fase móvel e 20 µL dessa solução diluída foram injetados no cromatógrafo. O sistema da cromatografia líquida de alta performance foi composto de uma bomba de água modelo 6000 equipada com um injetor automático de água modelo Wisp 717 e com um espectro monitor LDC Milton Roy modelo 3100, detector de comprimento de onda colocado a 205 nm e um integrador Delsi modelo Enica 21. As análises foram determinadas pelo uso de uma coluna 125 × 3 Merck Lichrospher RP-B mantida a 30°C. A fase móvel foi uma mistura a 22:78 (v/v) de acetonitrile e de solução aquosa de 0,01 M KH_2PO_4 , acidificada com 0,1% H_3PO_4 , a um fluxo de 0,5 mL/min.

3.1.1.3 Levobupivacaína Livre

A LVBP empregada é encontrada com o nome comercial de Novabupi® e consiste de 20 mL de solução injetável de Cloridrato de Levobupivacaína a 0,75%, em excesso enantiomérico de 50%, sem vasoconstritor, produzida pelo laboratório Cristália.

3.2 BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO

Após a anestesia dos ratos pela vaporização de halotano entre 2% a 4% em oxigênio, por máscara facial, foi possível a manipulação para injeção da solução diretamente sobre o nervo ciático.

Cada rato foi posicionado em decúbito lateral para palpação do ponto de referência anatômico, o sulco entre a cabeça do trocânter maior do fêmur e a tuberosidade isquiática, coincidente com a extremidade proximal do nervo ciático. A localização precisa do nervo foi identificada pela introdução de uma agulha 24 de teflon¹ conectada a um estimulador de nervo².

A localização do nervo ciático foi confirmada por contração muscular visível do membro com uma intensidade de estímulo de 0,2 miliampéres. O anestesiológista manteve a agulha imóvel na posição desejada enquanto um assistente injetou 0,5 mL de solução específica para cada grupo experimental. Uma vez concluído o bloqueio do nervo foi testada a eficiência do bloqueio colocando os animais sobre uma placa quente. Após esse procedimento, os ratos foram re-introduzidos nas gaiolas.

3.3 ESTUDO HISTOLÓGICO DO NERVO CIÁTICO

Após o 2º, 4º, 6º e 8º dias da aplicação das soluções ou pós-operatórios (PO), os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal de Tiopental 2,5% e, em seguida, a extremidade proximal do nervo ciático foi dissecada e fixada em solução de glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,4 M e encaminhadas para processamento no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

A avaliação do potencial neurotóxico da droga foi feita em MO e MET investigando-se: desmielinização, degeneração axonal e sinais de inflamação evidenciados por infiltração de células inflamatórias.

Os cortes semifinos (0,5 µm) foram corados pelo azul de toluidina e os campos que apresentaram boa qualidade de imagem foram fotografados e

¹ Modelo Stimuplex, Laboratório B. Braun, proveniente de Melsungen, Alemanha.

² Modelo DigiStim II, marca NeuroTechnology, proveniente de Houston, Texas.

submetidos à histomorfometria pela aplicação do programa Image Pro Plus versão 4,5. Realizou-se a medição do diâmetro de 10 axônios por campo fotografado totalizando o registro do diâmetro de 100 axônios por nervo.

Os cortes ultrafinos (70 nm) foram corados com Uranila a 2% e solução de Reynolds para posterior análise no microscópio JEOL JEM – 1.200 EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA HISTOMORFOMETRIA

Os resultados obtidos pela histomorfometria dos nervos ciáticos foram comparados dois a dois através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância considerado foi de 0,05, sendo corrigido por Bonferroni. Em função de serem efetuadas 6 comparações dos grupos dois a dois, serão consideradas diferenças significativas aquelas para os quais o valor de p for menor que 0,008.

4 RESULTADOS

Este estudo apresenta uma análise sistemática dos efeitos toxicológicos sobre o sistema nervoso periférico da BP, da LVBP em excesso enantiomérico de 50% incorporadas a microesferas e da LVBP livre aplicadas sobre nervo ciático de ratos Wistar. Utilizou-se a MET para a análise ultraestrutural de nervo ciático de ratos Wistar em busca de evidências sobre o efeito neurotóxico desses AL e das próprias microesferas. Aliada à análise ultraestrutural foi realizada histomorfometria sob microscopia de luz em busca de diferenças entre os diâmetros dos axônios que pudessem ser interpretadas como alteração neurotoxicológica.

A injeção extraneural de BP e LVBP em nervo ciático de ratos Wistar não provocou sinais de danos ultra-estruturais sugerindo que tal procedimento não oferece risco às células nervosas

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS CORTES SEMIFINOS

Nos cortes semifinos de todos os grupos e em todos os tempos estudados (2, 4, 6 e 8 dias PO), ilustrados nas FIGURAS 3 a 6, são observadas fibras de aspecto normal dentro dos fascículos. Observam-se axônios com diâmetro pequeno com uma bainha de mielina fina e axônios maiores com bainha de mielina espessa. Há uma distribuição regular homogênea nas fibras de colágeno no endoneuro. Não são observadas alterações degenerativas dos axônios ou das bainhas de mielina. Em vários cortes semifinos foram observados mastócitos. Não foram observadas células inflamatórias no endoneuro ou no perineuro. O aspecto desarranjado de algumas bainhas de mielina é interpretado como artefato de processamento. Um corte semifino de nervo ciático normal de rato Wistar é mostrado na FIGURA 7A.

4.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS CORTES ULTRAFINOS

Um corte ultrafino de um nervo ciático normal de rato Wistar é apresentado na FIGURA 7B. Nos cortes ultrafinos em todos os grupos de todos os tempos (2, 4, 6 e 8 dias PO), ilustrados nas FIGURAS 9 a 12, são observados axônios mielinizados

de aspecto normal e axônios não mielinizados envolvidos por células de Schwann em estruturas designadas como fibras de Remak. O axoplasma contém uma distribuição homogênea de neurofilamentos e microtúbulos com ocasionais mitocôndrias. Em alguns cortes são visualizados núcleos das células de Schwann associadas com o internodo de mielina (FIGURA 11C) e com as fibras de Remak (FIGURA 10D). É constatada a presença de fibroblastos (FIGURA 9A) e mastócitos no endoneuro (FIGURA 9C). Em todos os cortes examinados são conspícuas as fibras de colágeno em contato com a membrana basal das células de Schwann.

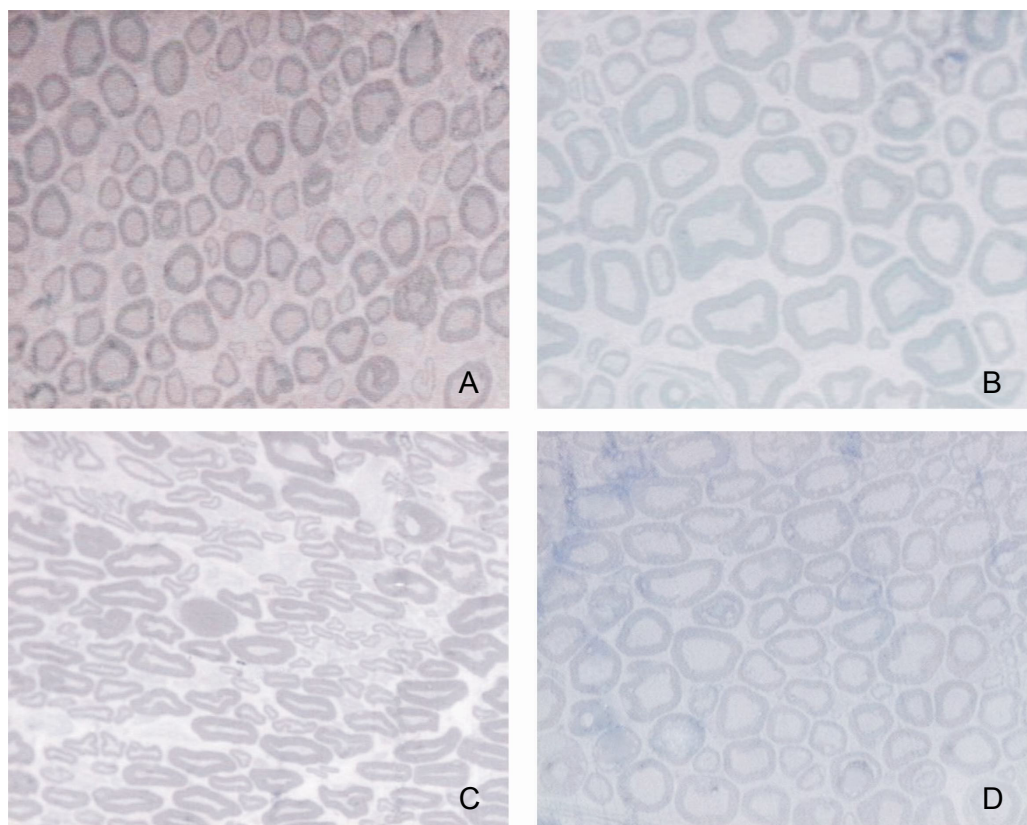


FIGURA 3 - Cortes semifinos dos nervos ciáticos dos ratos que receberam microesferas puras (Grupo M).

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Observam-se nas fotografias as características morfológicas normais dos axônios nessa magnificação. A maioria dos axônios está seccionada transversalmente com exceção do 1C no qual os axônios foram seccionados de forma oblíqua. As alterações observadas em algumas bainhas de mielina são consistentes com artefatos de processamento. 3A: Rato 8, 2º dia PO; 3B: Rato 6, 4º dia PO; 3C: Rato 10, 6º dia PO; 3D: Rato 29, 8º dia PO. Coloração: azul de toluidina. Objetiva 100X.

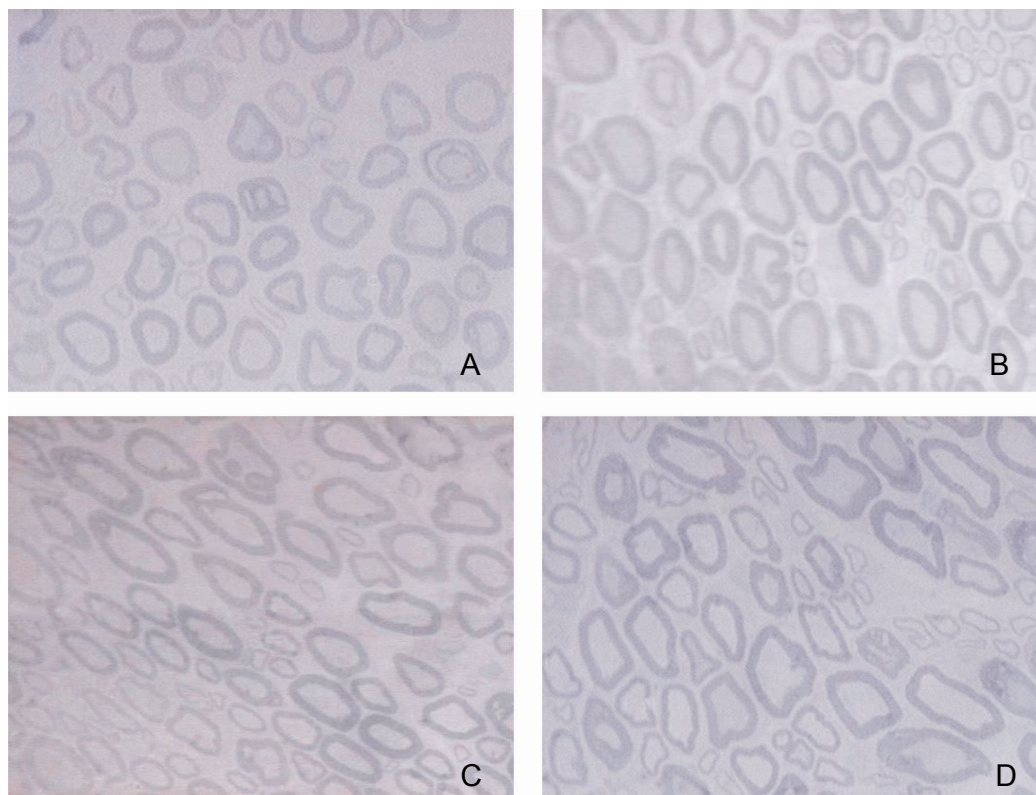


FIGURA 4 - Cortes semifinos dos nervos bloqueados com microesferas contendo LVBP (Grupo ML).

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Observam-se nas fotografias as características morfológicas normais dos axônios nessa magnificação. Os axônios estão seccionados transversalmente e obliquamente. As alterações observadas em algumas bainhas de mielina são consistentes com artefatos de processamento. 4A: Rato 30, 2° dia PO; 4B: Rato 4, 4° dia PO; 4C: Rato 11, 6° dia PO; 4D: Rato 23, 8° dia PO. Coloração: azul de toluidina. Objetiva 100X.

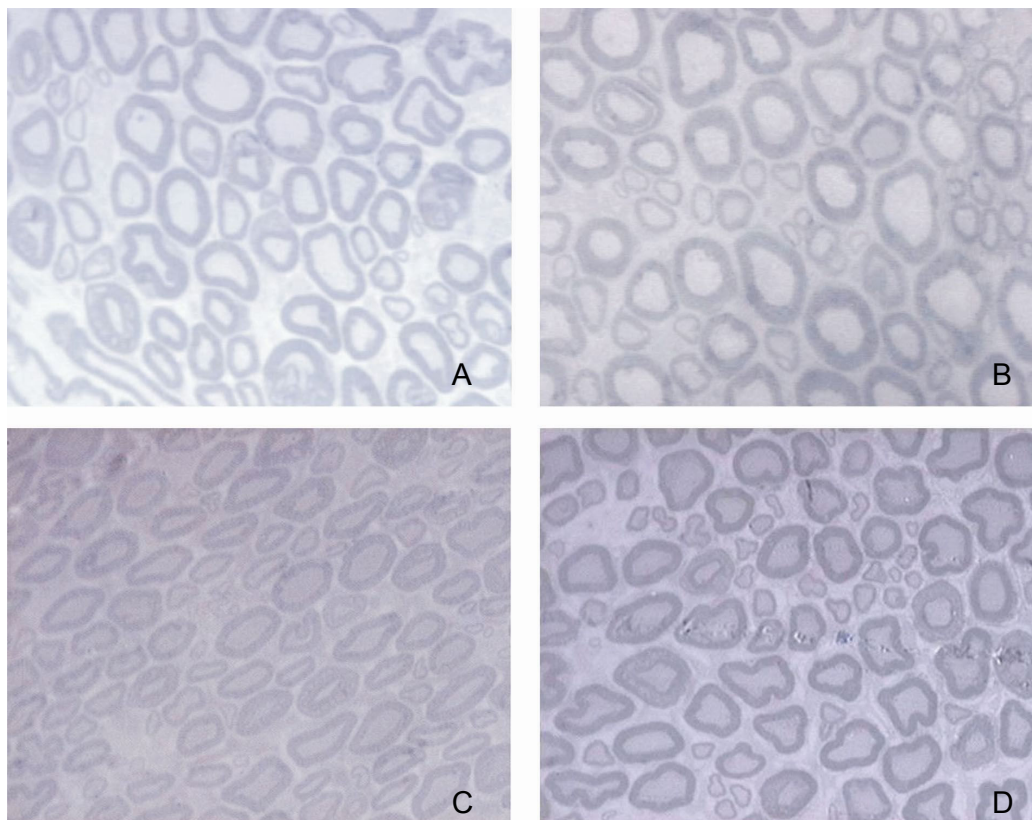


FIGURA 5 - Cortes semifinos dos nervos bloqueados com microesferas contendo BP (Grupo MB).

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Observam-se nas fotografias as características morfológicas normais dos axônios nessa magnificação. Os axônios estão seccionados transversalmente e obliquamente. As alterações observadas em algumas bainhas de mielina são consistentes com artefatos de processamento. 5A: Rato 2, 2º dia PO; 5B: Rato 9, 4º dia PO; 5C: Rato 14, 6º dia PO; 5D: Rato 28, 8º dia PO. Coloração: azul de toluidina. Objetiva 100X.

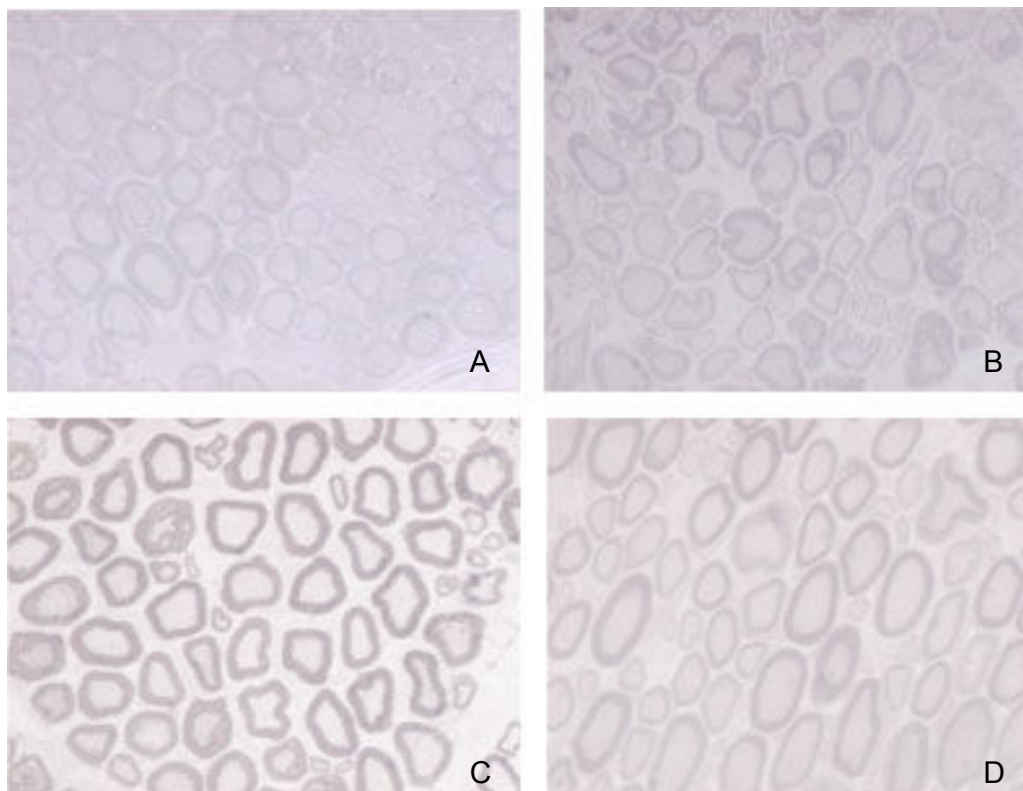


FIGURA 6 - Cortes semifinos dos nervos bloqueados com L a 0,75%, em excesso enantiomérico de 50% sem vasoconstritor (Grupo LL).

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Observam-se nas fotografias as características morfológicas normais dos axônios nessa magnificação. Os axônios estão seccionados transversalmente e obliquamente. As alterações observadas em algumas bainhas de mielina são consistentes com artefatos de processamento. 6A: Rato 5, 2º dia PO; 6B: Rato 13, 4º dia PO; 6C: Rato 7, 6º dia PO; 6D: Rato 21, 8º dia PO. Coloração: azul de toluidina. Objetiva 100X.

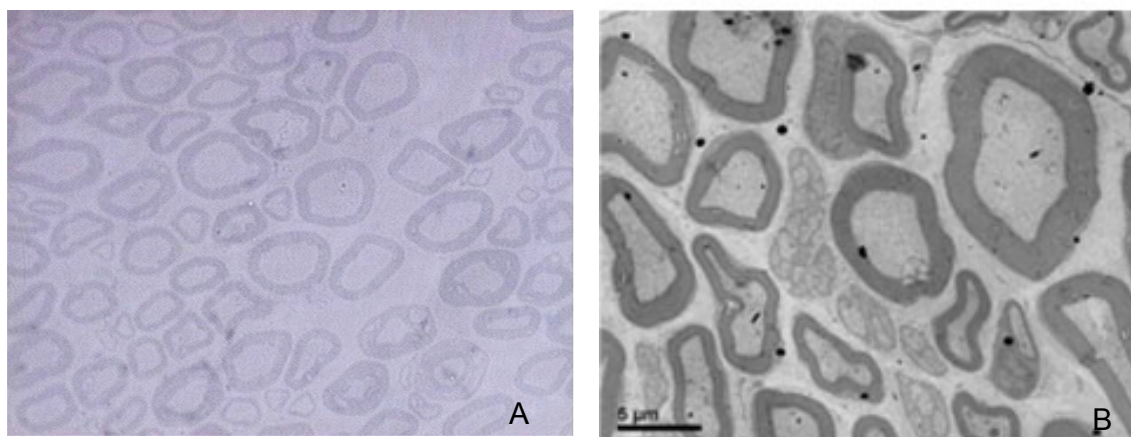


FIGURA 7 - Nervo ciático controle.

FONTE: A autora (2008)

NOTA: 7A: Observam-se na fotografia as características morfológicas normais dos axônios nessa magnificação. Corte semifino corado pelo azul de toluidina. Objetiva 100X.
7B: Ultramicrografia eletrônica de nervo ciático controle. Observam-se os axônios mielinizados e algumas fibras de Remak bem como o núcleos de células de Schwann .
B: 5µm.

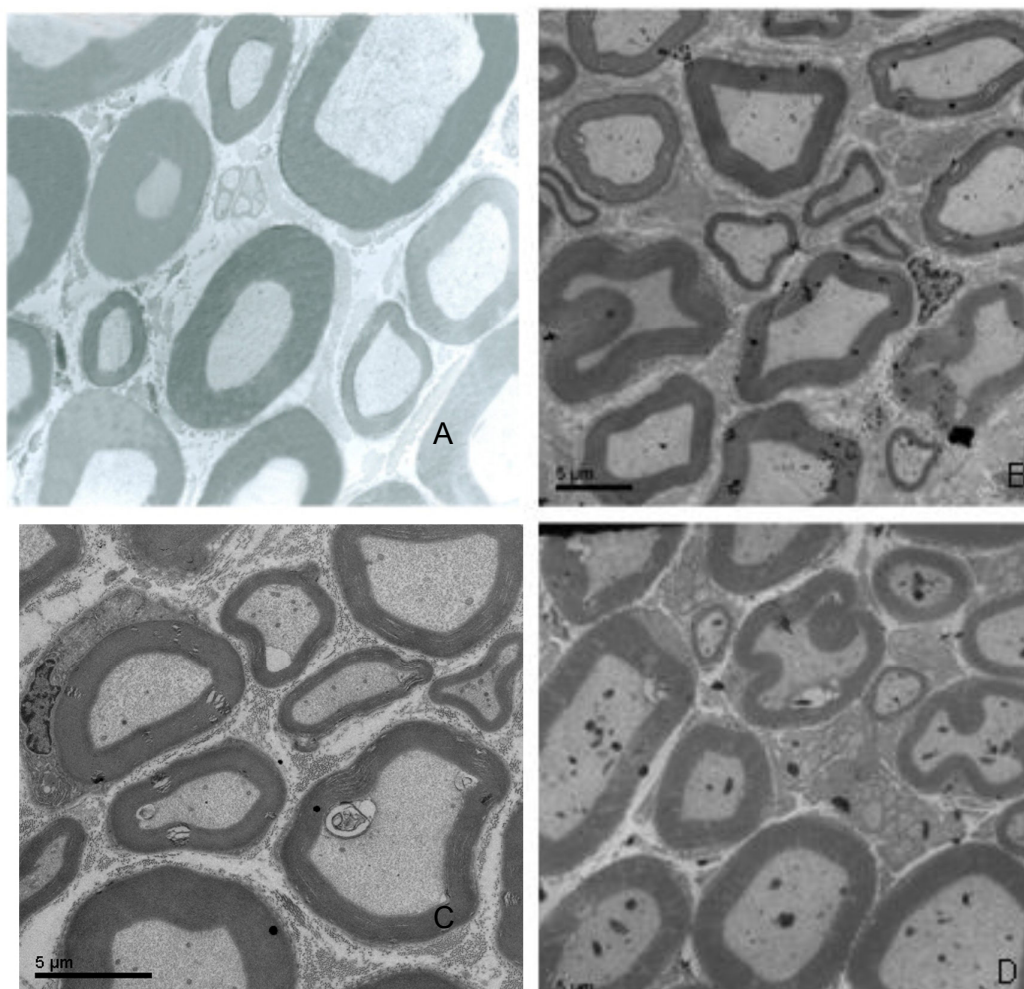


FIGURA 8 - Ultramicrografias eletrônicas dos nervos ciáticos dos ratos que receberam microesferas puras (Grupo M).

FONTE: A autora (2008)

NOTA: São observados axônios mielinizados e fibras de Remak. Entre as fibras nervosas observam-se feixes de colágeno. Algumas das bainhas de mielina apresentam deformação das lamelas decorrentes de artefatos de processamento. No interior dos axônios são observados microtúbulos e neurofilamentos com distribuição homogênea.
8A: Rato 8, 2º dia PO. 8B: Rato 6, 4º dia PO. 8C: Rato 10, 6º dia PO. 8D: Rato 29, 8º dia PO.

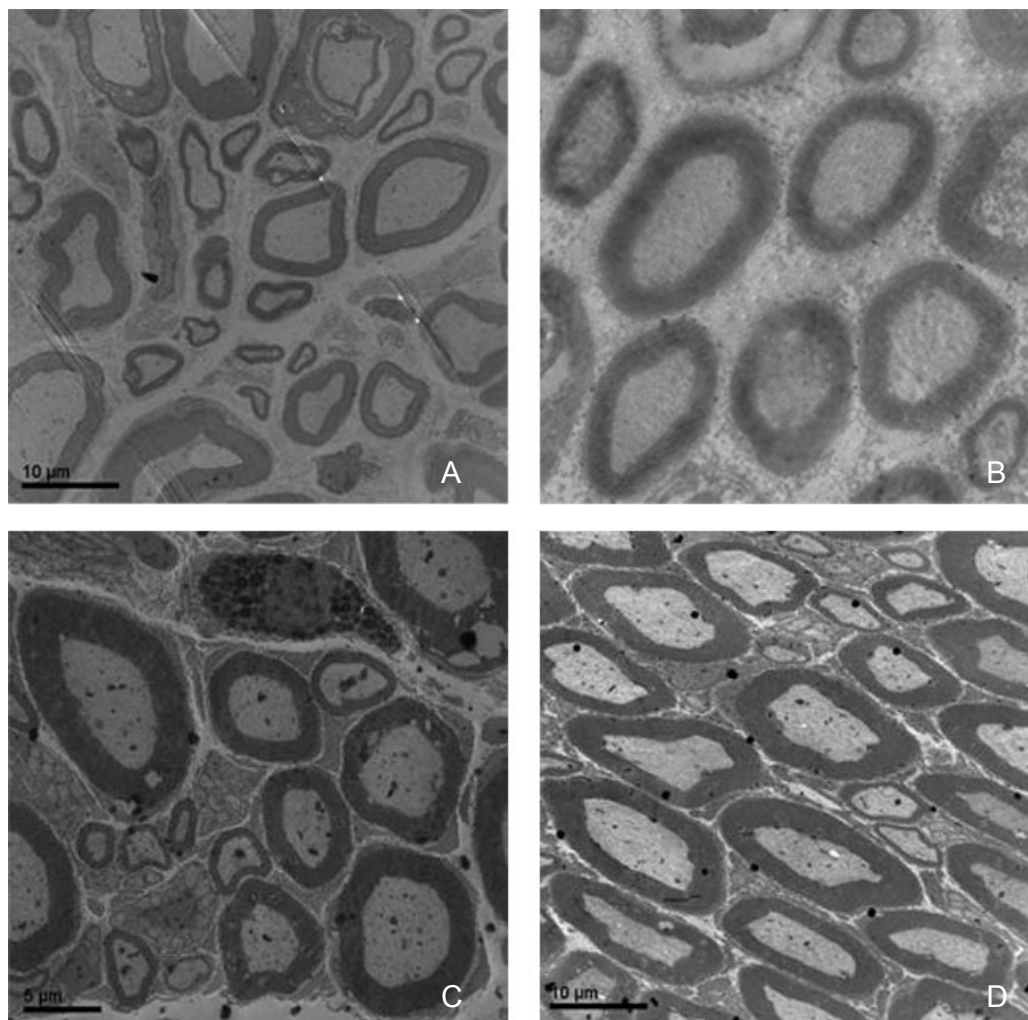


FIGURA 9 - Ultramicrografias eletrônicas dos nervos ciáticos anestesiados com microesferas contendo LVBP (Grupo ML).

FONTE: A autora (2008)

NOTA: São observados axônios mielinizados e fibras de Remak. Entre as fibras nervosas observam-se feixes de colágeno. Algumas das bainhas de mielina apresentam deformação das lamelas decorrentes de artefatos de processamento. No interior dos axônios são observados microtúbulos e neurofilamentos com distribuição homogênea. 9A: Rato 30, 2º dia PO. 9B: Rato 4, 4º dia PO. 9C: Rato 11, 6º dia PO. Observa-se um mastócito entre as fibras mielinizadas. 9D: Rato 23, 8º dia PO.

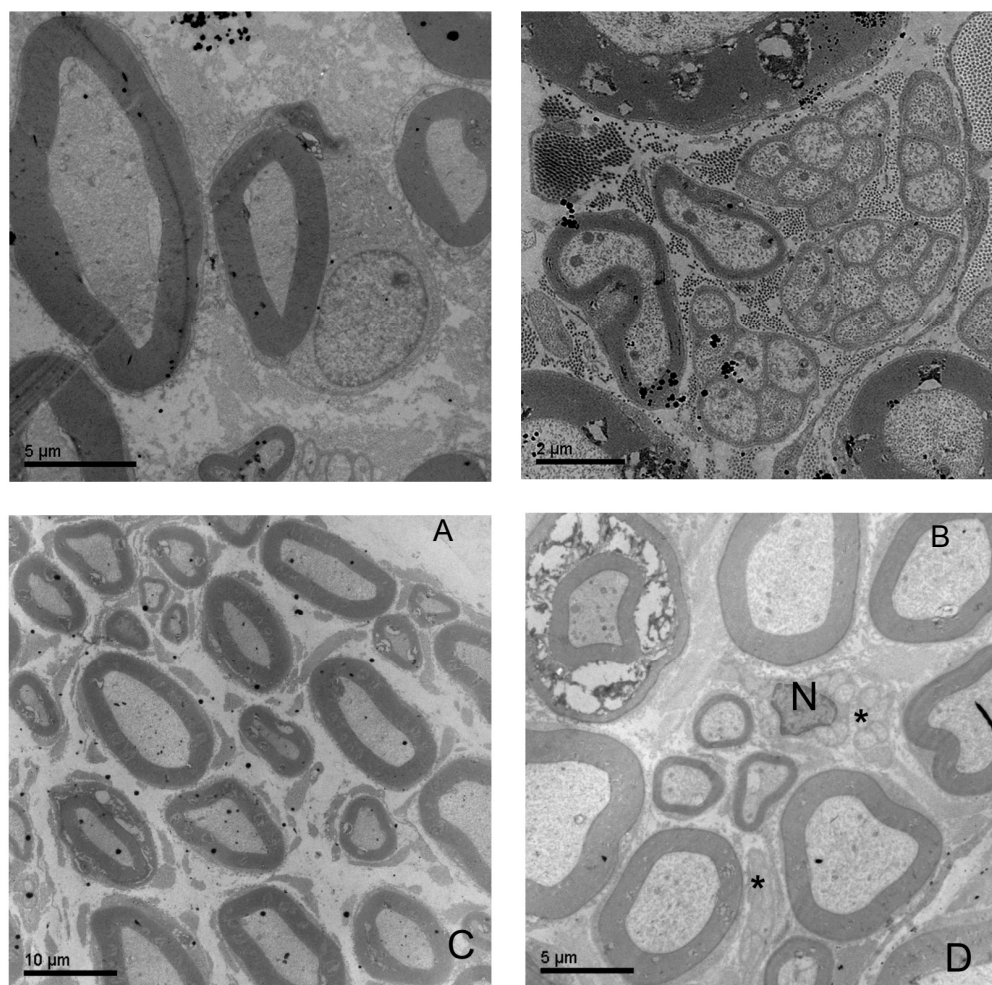


FIGURA 10 - Ultramicrografias eletrônicas dos nervos ciáticos anestesiados com microesferas contendo BP (Grupo MB).

FONTE: A autora (2008)

NOTA: São observados axônios mielinizados e fibras de Remak (*) e em uma delas é visualizado o núcleo da célula de Schwann (N). Entre as fibras nervosas observam-se feixes de colágeno. Algumas das bainhas de mielina apresentam deformação das lamelas decorrentes de artefatos de processamento. No interior dos axônios são observados microtúbulos e neurofilamentos com distribuição homogênea. 10A: Rato 2, 2º dia PO. 10B: Rato 9, 4º dia PO. 10C: Rato 14, 6º dia PO. 10D: Rato 31, 8º dia PO.

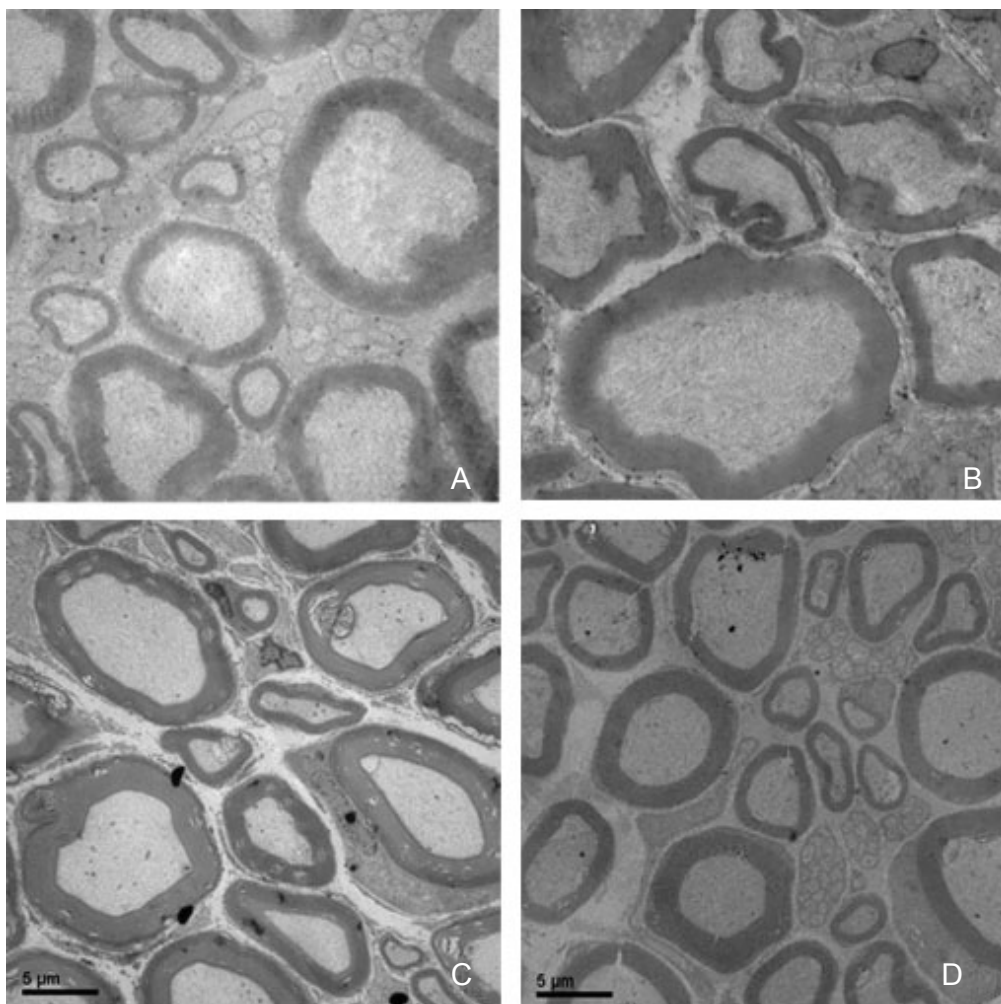


FIGURA 11 - Ultramicrografias eletrônicas dos nervos ciáticos anestesiados com L a 0,75%, em excesso enantiomérico de 50%, sem vasoconstritor (Grupo LL).

FONTE: A autora (2008)

NOTA: São observados axônios mielinizados, fibras de Remak e núcleos de células de Schwann. Entre as fibras nervosas observam-se feixes de colágeno. Algumas das bainhas de mielina apresentam deformação das lamelas decorrentes de artefatos de processamento. No interior dos axônios são observados microtúbulos e neurofilamentos com distribuição homogênea. 11A: Rato 5, 2º dia PO. 11B: Rato 13, 4º dia PO. 11C: Rato 7, 6º dia PO. 11D: Rato 21, 8º dia PO.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA HISTOMORFOMETRIA DOS NERVOS CIÁTICOS BLOQUEADOS

Os cortes semifinos dos nervos ciáticos de cada rato foram fotografados e submetidos à análise histomorfométrica com auxílio do programa Image Pro Plus versão 4,5. Em cada nervo ciático foram registrados os diâmetros de 100 axônios considerando-se como critério de seleção do axônio a coloração e o posicionamento central dos axônios no campo fotografado. Para a análise estatística foi considerada a média das 100 medidas obtidas em cada rato.

Testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos dois grupos sob comparação, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. A TABELA 1 apresenta os diâmetros mínimo, máximo e médio dos axônios considerando as 100 medições para cada um dos ratos. Nota-se que um dos ratos do grupo M apresentou a menor média do grupo.

TABELA 1 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO DIÂMETRO MÉDIO DAS 100 MEDIÇÕES DOS AXÔNIOS DO NERVO CIÁTICO DOS RATOS DOS DIFERENTES GRUPOS

Grupo	n	Diâmetro (μm)				
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
ML	4	4,63	4,62	4,26	5,02	0,31
LL	4	5,33	5,21	5,00	5,91	0,42
MB	4	4,56	4,69	3,71	5,15	0,61
M	3	4,65	4,71	4,40	4,83	0,23

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Grupo ML = Ratos que receberam injeção extraneural de microesferas de LVBP em excesso enantiomérico de 50% (S75 – R25).

Grupo LL = Ratos que receberam injeção extraneural de LVBP livre.

Grupo MB = Ratos que receberam injeção extraneural de microesferas de BP.

Grupo M = Ratos que receberam injeção extraneural de microesferas puras.

n = número de ratos por grupo.

μm = micrômetros.

O GRÁFICO 1 ilustra os resultados obtidos no estudo considerando os diâmetros máximo e mínimo, a média dos diâmetros e o desvio padrão para cada grupo.

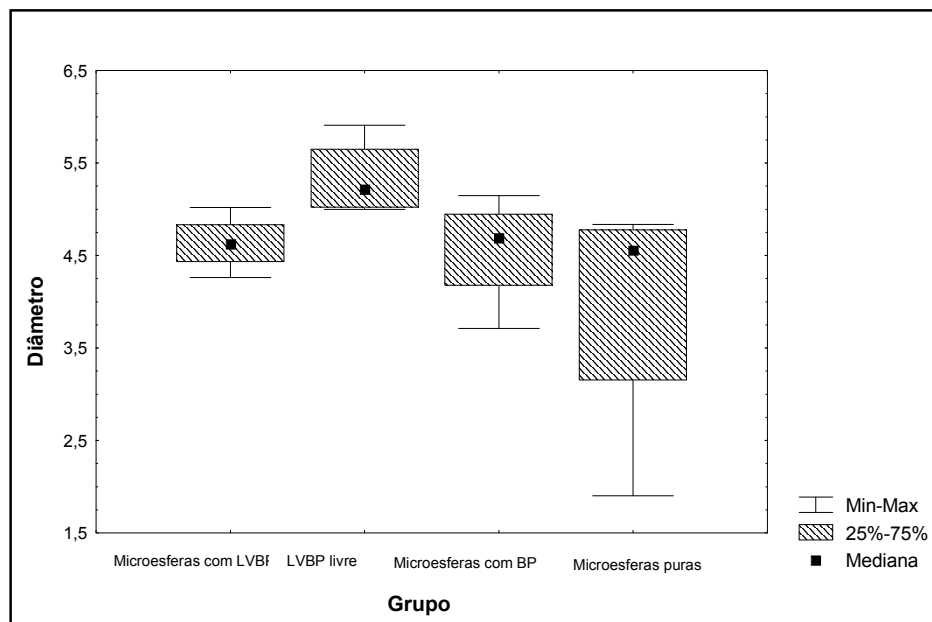


GRÁFICO 1 – Resultados obtidos na histomorfometria considerando o diâmetro (μm) de 100 axônios por nervo ciático analisado.

FONTE: A autora (2009)

O grupo ML apresentou um diâmetro mínimo de 4,26 μm; diâmetro máximo de 5,02 μm; média de 4,63 μm e desvio padrão de 0,31. O grupo LL apresentou um diâmetro mínimo de 5,00 μm; diâmetro máximo de 5,91 μm; média de 5,33 μm e desvio padrão de 0,42. O menor diâmetro registrado do grupo MB foi de 3,71 nm; o maior diâmetro foi de 5,15 μm; a média foi 4,56 μm e o desvio padrão 0,61. O grupo M apresentou o menor diâmetro de todos os grupos com 1,90 μm; o diâmetro máximo foi 4,83 μm, a média foi 3,96 μm e o desvio padrão foi de 1,39. Observa-se que o grupo M apresentou uma maior dispersão dos resultados.

Na TABELA 2 são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois. Testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos dois grupos sob comparação, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes.

TABELA 2 - VALORES DE p DAS COMPARAÇÕES DOS GRUPOS DOIS A DOIS

Grupos sob comparação	Valor de p*
ML x LL	0,057
ML x MB	0,886
ML x M	0,886
LL x MB	0,114
LL x M	0,029
MB x M	0,686

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Grupo ML = Ratos que receberam injeção extraneural de microesferas de LVBP em excesso enantiomérico de 50% (S75 – R25).

Grupo LL = Ratos que receberam injeção extraneural de LVBP livre.

Grupo MB = Ratos que receberam injeção extraneural de microesferas de BP.

Grupo M = Ratos que receberam injeção extraneural de microesferas puras.

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,008$.

Tendo em vista o registro do menor diâmetro no rato 3 do grupo M e a variabilidade provocada por ele, os valores obtidos no nervo ciático do rato 3 do grupo M foram desconsiderados gerando, então, o Gráfico 2. As estatísticas descritivas do grupo M, desconsiderando-se o rato 3, são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS GRUPOS APÓS A EXCLUSÃO DA AMOSTRA 3 DO GRUPO M

Grupo	n	Diâmetro (μm)				Desvio padrão
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo	
ML	4	4,63	4,62	4,26	5,02	0,31
LL	4	5,33	5,21	5,00	5,91	0,42
MB	4	4,56	4,69	3,71	5,15	0,61
M	3	3,96	4,56	1,90	4,83	1,39

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Grupo ML = Ratos que receberam injeção extraneural de microesferas de LVBP em excesso enantiomérico de 50% (S75 – R25).

Grupo LL = Ratos que receberam injeção extraneural de LVBP livre.

Grupo MB = Ratos que receberam injeção extraneural de microesferas de BP.

Grupo M = Ratos que receberam injeção extraneural de microesferas puras.

n = número de ratos por grupo.

μm = micrômetros.

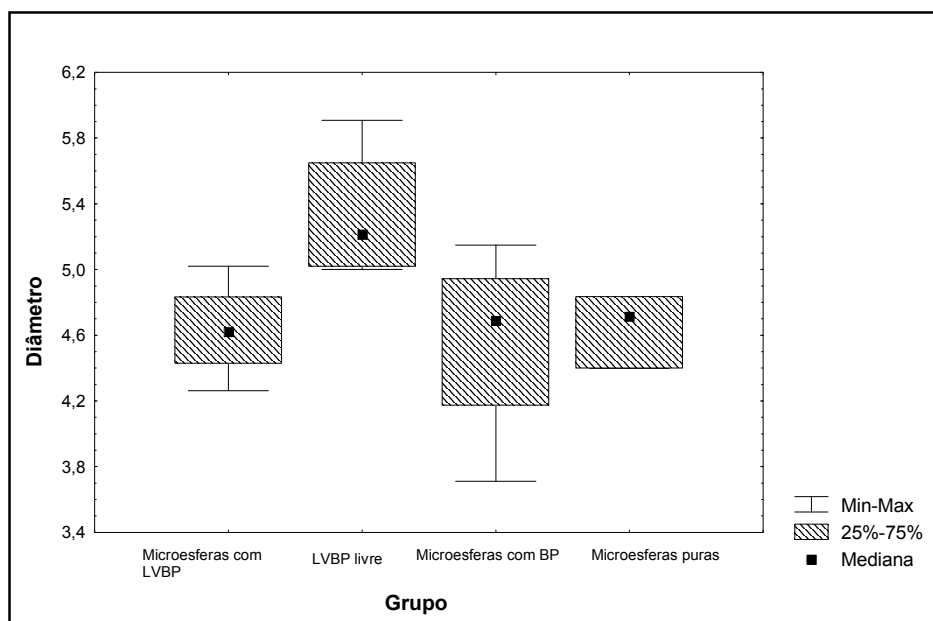


GRÁFICO 2 - Diâmetros mínimo e máximo (µm), mediana e desvio padrão dos grupos ML, LL, MB e M após a eliminação dos registros obtidos no nervo ciático do rato 3 do grupo M.
 FONTE: A autora (2009)

5 DISCUSSÃO

O objetivo dos ALs é bloquear a propagação do potencial de ação impedindo a sua transmissão até o sistema nervoso central. Entretanto, esse bloqueio já pode ser considerado um efeito neurotóxico (KALICHMAN, 1993).

A modificação da estrutura química dos ALs para aumentar a duração dos seus efeitos tem sido o objetivo de pesquisadores que, mais recentemente, têm concentrado esforços no desenvolvimento de sistemas de liberação de drogas. Durante os anos 1990, vários carreadores alternativos e veículos de liberação foram investigados quanto ao tempo de duração do efeito. Estes incluíram implantes biodegradáveis, soluções à base de lipídios, suspensões, emulsões e alterações de pH (GRANT; BANSINATH, 2001; ROSE et al., 2005).

Neste estudo foram usadas microesferas de ácido polilático-co-glicólico e investigadas alterações das fibras nervosas periféricas causadas por essas microesferas puras ou com os ALs selecionados (bupivacaína racêmica e bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%).

A infiltração local de analgésico no local da dor evita os efeitos colaterais dos opióides, como depressão respiratória, sedação, náusea, prurido, retenção urinária e dependência. Entretanto, resultados obtidos em estudo sobre a aplicação local dos anestésicos não indicaram grandes vantagens, pois sendo moléculas relativamente pequenas, os ALs atravessam as paredes dos vasos sanguíneos e são removidos rapidamente do local da injeção. Essa redistribuição limita a duração do efeito analgésico (GRANT; BANSINATH, 2001). É esperado, portanto, que a liberação desses ALs seja mais demorada devido à sua inclusão dentro das microesferas.

O desenvolvimento de sistemas de liberação de medicamentos com alta atividade no local da aplicação, sem efeitos tóxicos, está sendo objeto de numerosas investigações. A ciência avançou substancialmente com relação ao desenvolvimento de sistemas poliméricos biodegradáveis para liberação controlada de agentes bioativos (SAEZ et al., 2004).

A toxicidade da BP para os sistemas nervoso central e cardiovascular levou à pesquisa de novos ALs com perfil semelhante de bloqueio e menos tóxicos, surgindo novas preparações como a LVBP. Em estudo sobre a avaliação da eficácia do bloqueio de nervo ciático de camundongos, ARAÚJO et al. (2005) concluíram que a mistura enantiomérica de BP (S75 – R25) é uma alternativa para o

desenvolvimento de formulações de liberação controlada mais seguras e eficazes do que a BP (S50 – R50).

Pesquisas com formulações de AL de liberação controlada têm mostrado resultados promissores. Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento dessas formulações, ainda são necessários estudos para a avaliação da neurotoxicidade local de forma a garantir sua utilização segura na rotina clínica (ARAÚJO et al., 2003).

Este experimento contribui a essas pesquisas demonstrando que a composição das microesferas descrita na página 28 não causa efeitos deletérios nas fibras nervosas.

O uso de um número pequeno de animais (n=16) deve-se a vários fatores: por um lado as limitações decorrentes das novas diretrizes de bem-estar animal; e por outro, as limitações financeiras que um estudo com a metodologia desenvolvida exige.

5.1 A ESCOLHA DO MODELO

Estudos *in vivo* têm a vantagem de oferecer as variações naturais como difusão e diluição proporcionadas pelo fluido extracelular que não são permitidas nos estudos *in vitro*. Além disso, os efeitos de um AL dependem da sua interação com o suprimento sanguíneo local. As interações do AL com um tecido intacto podem revelar mecanismos que não poderiam ser vistos em experimentos *in vitro* (KALICHMAN, 1993).

O nervo ciático é o ponto de partida para o estudo *in vivo* de AL compondo com as investigações *in vitro* os requisitos da fase pré-clínica de novos compostos, antes das fases de investigação no ser humano (SIMONETTI, 1997). De acordo com ESTEBE; MYERS (2004), o nervo ciático de rato é um modelo experimental mamífero bem estabelecido para pesquisas sobre toxicologia de nervo periférico.

Desde a sua primeira produção e caracterização, as microesferas vêm sendo testadas em nervo ciático de ratos. A linhagem de rato Wistar é uma das mais usadas no mundo, é uma variação albina da espécie *Rattus norvegicus albinus* que se caracteriza pela ausência completa do pigmento melanina nos pêlos e na íris (ANDERSEN et al., 2004). A utilização do rato Wistar respeita um dos requisitos

fundamentais da pesquisa científica: a reprodutibilidade. Isso significa que a pesquisa poderá ser realizada com um mesmo modelo em várias regiões do mundo.

De acordo com MILLS et al. (1996) a disponibilidade, a presença de parâmetros referenciais na literatura, facilidade para manipulação e alta padronização genética e ambiental, fazem dos roedores as espécies mais utilizadas em experimentação animal. Outras vantagens incluem: pequeno tamanho, curto tempo de gestação, informações bem documentadas sobre fisiologia, patologia e processos metabólicos, e baixo custo para aquisição e manutenção.

Justifica-se o uso de animais de laboratório diante da necessidade de se conhecer os efeitos colaterais dos anestésicos a serem aplicados em seres humanos. Assim sendo, a experimentação animal pode fornecer subsídios para o entendimento das reações aos AL e o reconhecimento da toxicidade aguda. Além disso, estudos experimentais *in vivo* podem permitir o entendimento dos mecanismos de neurotoxicidade concentração-dependente e sensorial-seletiva.

O bloqueio do nervo ciático de rato Wistar foi o modelo experimental escolhido em função das descrições detalhadas encontradas na literatura e por ser uma técnica de fácil reprodutibilidade (SIMONETTI et al., 1997; SINNOT; STRICHARTZ, 2003). A técnica da injeção transcutânea na posição posteromedial em relação ao trocânter maior do fêmur para a aplicação dos AL sobre o nervo ciático de rato foi baseada nas metodologias propostas por CURLEY et al. (1996); KOHANE et al. (1998) e ESTEBE et al. (2004).

A metodologia da injeção foi adequada porque após a recuperação da capacidade proprioceptiva do membro anestesiado, os animais não mostraram sequelas motoras ou sensoriais.

5.2 A ESCOLHA DO BIOMATERIAL DAS MICROESFERAS

A escolha do polímero das microesferas é fator importante. Segundo SAEZ et al. (2004), os biomateriais devem ser biocompatíveis, o que significa que não devem causar nenhuma resposta adversa significativa do meio fisiológico que o recebe; devem interagir com tecidos e fluidos corporais e, por fim, devem biodegradar-se em componentes não tóxicos tanto química quanto fisicamente.

Esse conceito de biocompatibilidade já havia sido descrito por BLANCO et al. (1999) que consideravam os sistemas de copolímeros poliláticos e poliglicólicos como sendo biocompatíveis, pois originam compostos que podem ser metabolizados pela lactato desidrogenase na via de degradação do ácido láctico e pelo metabolismo da glicina.

Os materiais mais adequados para a síntese de microesferas são aqueles que permitem a eliminação pelo organismo de produtos de degradação que se transformam em CO₂ e H₂O pelas vias metabólicas usuais (SAEZ et al., 2004).

As microesferas são polímeros estruturalmente estáveis, biodegradáveis e que apresentam propriedades interessantes já que, além de promover a liberação prolongada de anestésicos, permitem injeção local por meio de agulha e têm capacidade de armazenar boa quantidade do medicamento a ser utilizado (ROSE et al., 2005; TANAKA et al., 2008).

Várias drogas podem ser incorporadas às microesferas e se difundir através da sua matriz polimérica permitindo, dessa forma, a criação de um sistema de liberação capaz de prolongar os seus efeitos farmacológicos (ROSE et al., 2005).

As microesferas sintetizadas a partir de copolímero de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) permitem a incorporação de maior quantidade de droga ativa do que as microesferas de ácido polilático (LE CORRE; LE GUEVELLO; GAJAN, 1994; ROSE, 2005). As microesferas utilizadas neste estudo foram preparadas utilizando o PLGA com tamanho médio de 10,74 µm.

Tendo em vista a capacidade de armazenar maior quantidade de BP quando comparada àquela aplicada diretamente no neuroeixo ou em ramos nervosos, existe grande preocupação acerca do potencial das microesferas de provocar alterações hemodinâmicas, toxicidade sistêmica, reação tecidual localizada e neurotoxicidade (ROSE et al., 2005).

5.3 A ESCOLHA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Em razão da qualidade de sua anestesia e de sua ação prolongada, a BP é o AL mais comumente utilizado na anestesia regional (SIMONETTI et al., 1997). Entretanto, pesquisas têm sido direcionadas na busca por novos ALs de longa duração e com menores efeitos cardiovasculares. Embora a BP seja sintetizada na

forma de dois isômeros, dextrógiro R(+) e levógiro L(-), há alguns anos ela era comercializada somente na forma de mistura racêmica contendo 50% de cada um desses isômeros. Recentemente, o isômero levógiro, denominado LVBP, começou a ser estudado em modelos animais e mostrou que a sua dose letal era 1,6 vezes maior que a dose letal da mistura racêmica graças ao seu menor efeito inotrópico negativo. Entretanto, esse novo agente, embora com a mesma potência analgésica, apresenta menor intensidade de bloqueio motor. Por essa razão, a indústria fornece um produto com 75% do isômero levógiro e 25% do isômero dextrógiro conhecido como “mistura com excesso enantiomérico de 50%” (LE CORRE et al., 1997; UDELSMANN et al., 2007).

Pesquisas têm apontado o componente dextrógiro da BP como cardiotoxíco e consideram o componente levógiro, a LVBP, uma alternativa ao uso da BP racêmica (SIMONETTI, 1997). Apesar de resultados recentes considerarem a LVBP menos prejudicial do que a BP, ambas são capazes de induzir toxicidade local e sistêmica. Após infusão contínua de 5 mg/mL de BP durante 6 horas em nervo femoral de porcos, ZINK; GRAF (2008) observaram em amostras de músculo retirado da área próxima à área de implantação do cateter: edema intersticial, desintegração das estruturas intracelulares e extensa mionecrose.

Os AL usados neste estudo, a BP e a LVBP em microesferas assim como a LVBP livre, foram eficientes na indução da anestesia do membro produzindo o bloqueio regional esperado. Vários estudos avaliaram os efeitos tóxicos sistêmicos da BP incorporada a microesferas, no entanto, a escala da dose e a toxicidade das microesferas de LVBP em excesso enantiomérico de 50% ainda não foram definidas.

5.4 A ESCOLHA DO MÉTODO DE ANÁLISE HISTOLÓGICA

É imperativo que uma droga seja testada para neurotoxicidade periférica empregando-se técnicas neuropatológicas estabelecidas com maiores sensibilidade e resolução que as preparações de parafina coradas com hematoxilina e eosina. Embora seja útil para a avaliação de alterações histológicas mais evidentes, a MO pode ocultar alterações recentes entre os axônios, células de Schwann e mielina que indiquem mecanismos neurotoxicológicos (ESTEBE; MYERS, 2004).

Para MRAK (2002), a comprovação de alterações estruturais induzidas por drogas depende da análise ultraestrutural.

A escolha do estudo por análise de cortes semifinos e ultrafinos já foi proposta por MRAK (2002) e UCHINO et al. (2005) e pode ser considerada a mais apropriada, pois muitas vezes, as alterações clínicas não correspondem com as alterações histológicas ou são muito tênues, portanto, somente o estudo ultraestrutural permite observar lesões discretas.

Em estudo realizado por BOOGAERTS (1995) com lipossomas aplicados no plexo braquial de coelhos, observou-se discreta inflamação perineural na MO, no entanto, a ME não revelou sinais histológicos de neuropatologia.

Tendo em vista a necessidade de uma análise criteriosa em busca de lesão axonal e desmielinização, o presente estudo apresenta a avaliação da ultraestrutura de nervos ciáticos de ratos que foram bloqueados com BP e LVBP em microesferas, LVBP pura e microesferas puras através de injeção percutânea.

Destruição de bainha de mielina e axônios e infiltração de macrófagos foram observadas por TAKENAMI et al. (2005) após a aplicação de lidocaína a 10% e 20% e de BP a 5% via intratecal em ratos Wistar. As lesões neurotóxicas causadas pelas duas drogas foram indistinguíveis mesmo em ME e indicavam serem causadas por degeneração axonal vista com maior intensidade no sistema sensorial das raízes nervosas dorsais. Esses resultados sugeriram que neurônios motores são menos susceptíveis a neurotoxicidade local em comparação com os neurônios sensoriais. No entanto, a histologia intacta do sistema motor não prova que os ALs sejam inócuos a esse sistema.

Para GERNER et al. (2005), são necessários estudos em ME já que a MO não possibilita a diferenciação de fibras nervosas não mielinizadas. Portanto, a análise em MO não fornece resultados conclusivos sobre a maior frequência de lesão em fibras nervosas pequenas e não mielinizadas. Portanto, somente a ME é capaz de comprovar o fenômeno conhecido como “neurotoxicidade sensorial seletiva”.

DYRE et al. (2006) reforçam essa opinião e indicam a ME como um teste mais sensível capaz de diferenciar lesões neurotóxicas ultraestruturais. Ao avaliar os efeitos neurotóxicos de seis formulações lipídicas de depósito diferentes constituídas por uma mistura de BP e lidocaína sobre nervo ciático de ratos, observaram, através de MO, tumefação axonal, degeneração neuronal e desmielinização em nervos

anestesiados com 64% de BP e lidocaína na proporção de 4:1. Apesar desses achados, concluíram que a BP pode ser usada como composto ativo de formulações de depósito e sugeriram que o seu potencial neurotóxico deve ser avaliado por testes mais sensíveis, tal como a MET.

A despeito dos resultados encontrados por DYRE et al. (2006), nenhuma das amostras deste estudo apresentou sinal de neurotoxicidade quando analisadas tanto por MO quanto por ME.

5.5 TOXICIDADE SISTÊMICA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

De acordo com ENNEKING et al. (2005), existem poucos relatos sobre toxicidade sistêmica associada a bloqueio de segmentos distais do SNP. No entanto, há vários casos relatados de grave toxicidade após bloqueio de plexo lombar e segmento proximal de nervo ciático. Essas reações tóxicas ocorrem durante ou imediatamente após a injeção, sugerindo que a causa seja a injeção intravascular não intencional.

Apesar da sua raridade, a intoxicação por AL pode ser catastrófica ao indivíduo. Por isso, a administração de doses fracionadas permite ao anestesiológista interromper a administração quando são observados sinais de toxicidade (MATHER et al., 2005).

Até recentemente, a BP tem sido o anestésico de escolha nos bloqueios locorreionais em razão da qualidade da anestesia proporcionada e pela sua duração. Apesar disso, a sua toxicidade cardiovascular preocupa anestesiológistas que procuram novas opções farmacológicas com menor grau de toxicidade sistêmica. Uma destas opções é o seu isômero levógiro, a LVBP, que por menor afinidade aos canais de sódio do miocárdio, seria menos cardiotoxica. Outra opção é a apresentação contendo 75% do isômero levógiro e 25% do isômero dextrógiro, denominada mistura com excesso enantiomérico de 50% (UDELSMANN et al., 2007).

De acordo com MATHER et al. (2005), o efeito colateral mais preocupante dos ALs é a toxicidade aguda provocada pela administração intravascular acidental. Com o objetivo de descrever os efeitos da intoxicação aguda por AL provocada por injeção intravascular acidental, os pesquisadores simularam acidentes clínicos com

BP em ovelhas. Dois minutos após a infusão intravenosa de BP observaram alterações hemodinâmicas agudas e depressão do miocárdio, além de distúrbios da condução cardíaca e convulsões. Relataram que a LVBP e a ropivacaína apresentaram menor risco de toxicidade aos sistemas nervoso central e cardiovascular de ovelhas e humanos do que a BP racêmica, à diferença do descrito por HUANG et al. (1998) e BARDSLEY et al. (1998).

UDELSMANN et al. (2007) simularam injeção venosa acidental em modelo suíno e observaram maior repercussão hemodinâmica da mistura em excesso enantiomérico de 50% seguida daquela obtida com a LVBP e, em menor grau, com a BP.

Segundo CURLEY et al. (1996), toxicidade sistêmica pode ser evidenciada como sonolência, convulsões ou morte. O estudo de efeitos adversos sistêmicos da BP e da LVBP não fez parte dos objetivos deste trabalho, porém, não foram observadas alterações comportamentais nem sinais de automutilação em nenhum dos animais utilizados.

5.6 NEUROTOXICIDADE RELACIONADA À LIBERAÇÃO LENTA DO ANESTÉSICO LOCAL SOBRE NERVO PERIFÉRICO

De acordo com KALICHMAN (1993), o potencial neurotóxico dos ALs não está relacionado ao seu pH ou à osmolaridade da solução, com a presença de aditivos, com constantes de dissociação ou com lipossolubilidade. Na sua opinião, a toxicidade depende da concentração local do anestésico e o bloqueio da condução nervosa pode ser resultado do efeito direto sobre o axônio ou sobre a célula de Schwann, ou do efeito indireto causado pelas mudanças no microambiente do nervo.

O processo patológico indicativo de neurotoxicidade mais mencionado na literatura é a degeneração walleriana que foi descrita pela primeira vez por Augustus Waller em 1850. É um processo complexo desencadeado por uma injúria ao axônio e resulta na degeneração do axônio e das suas células de suporte, conjunto conhecido como fibra nervosa. Inicialmente, ocorre agrupamento de organelas e outras estruturas do axoplasma evoluindo a edema do axônio e desintegração. A mielina se desintegra e é fagocitada pelas células de Schwann e por macrófagos

que são recrutados em grande número em resposta ao aumento do fator de necrose tumoral e de proteínas pró-inflamatórias (ESTEBE; MYERS, 2004).

Segundo KALICHMAN (1993), um aumento da permeabilidade da barreira hemato-neural provocados pelos ALs pode aumentar a osmolaridade do fluido intersticial levando à redução do tamanho dos axônios ou à alteração dos gradientes de concentração dos íons inorgânicos e, conseqüentemente, diminuir a condução nervosa.

Neste estudo foi considerada a hipótese de que a presença das microesferas e a liberação lenta do AL causariam alteração da permeabilidade dos vasos sanguíneos locais tornando-os mais permeáveis permitindo o extravasamento de proteínas osmoticamente ativas que normalmente não são encontradas próximas ao endoneuro, e que poderiam atrair água e limitar, dessa forma, o espaço dos axônios e células endoneurais. Nas imagens de ME, contudo, não foi vista distensão do espaço interaxonal e intercelular no endoneuro que caracterizaria o extravasamento de plasma.

DRAGER et al. (1998) já recomendavam a realização de estudos voltados para a investigação de lesão axonal ou desmielinização provocadas por microesferas preenchidas com BP.

BLANCO et al. (1999) implantaram matriz com microesferas no tecido subcutâneo de ratos Wistar e observaram que as microesferas começaram a degradar 15 dias após a aplicação do implante. No entanto, no presente estudo nenhuma microesfera foi observada sobre os nervos ciáticos estudados indicando que as microesferas depositadas já estavam degradadas 2 dias após a sua aplicação. Uma razão para essa discordância reside na matriz utilizada na produção das microesferas. Enquanto a metodologia de Lee et al. (1981) incluiu progesterona no interior de gotículas de albumina sérica, a nossa responde ao protocolo descrito na página 28.

Ao revisar estudos experimentais sobre lipossomas em animais, GRANT; BANSINATH (2001) sugeriram que a toxicidade tecidual poderia ser produzida pelos próprios lipossomas. No entanto, consideravam remota essa possibilidade já que os lipossomas são biocompatíveis e biodegradáveis, e atribuíram à exposição prolongada do tecido ao AL uma provável causa da reação tecidual toxicológica.

Para MURAUSKI; GONZALEZ (2002), lesão de nervo periférico provocada por anestesia local pode ser resultado de fatores como: trauma pela agulha e injeção

intraneural inadvertida que levaria à neuropatia química. Segundo ENNEKING et al. (2005), a incidência de lesão nervosa provocada pelo bloqueio de sistema nervoso periférico é subestimada e acreditam que lesão neurológica também possa estar relacionada à isquemia neuronal. A relação entre isquemia e lesão axonal já havia sido sugerida por KALICHMAN et al. (1988) quando encontraram extensa desmielinização paranodal após a aplicação de tetracaína e procaína sobre nervo periférico de rato.

Ao contrário da instabilidade da bainha de mielina demonstrada através de ME e raio-x por MATEU et al. (1992) após a aplicação de tetracaína sobre nervo óptico e ciático isolado de ratos, neste estudo não foram evidenciadas alterações nas células de Schwann, que segundo MATEU et al. (1992) incluem: vacuolização e desintegração citoplasmáticas, e acúmulo de gotículas de gordura no citoplasma indicativas de interrupção do metabolismo lipídico.

A hipótese de que a duração do bloqueio poderia estar diretamente associada com a concentração do AL foi considerada por KALICHMAN (1993). Para ele, um bloqueio nociceptivo prolongado poderia indicar degeneração nervosa. Além disso, o autor acreditava que as fibras nervosas sensoriais eram mais afetadas que as fibras nervosas motoras e que drogas com tal propriedade poderiam ser úteis para pacientes com dor neuropática ou dor provocada por câncer.

Para ESTEBE; MYERS (2004), o efeito do anestésico deve ser diferenciado do seu efeito neurotóxico já que o tempo de duração do bloqueio pode ser confundido com o efeito tóxico dose-dependente do anestésico. Segundo esses autores, o bloqueio prolongado provocado pela injeção extraneural de amitriptilina sugeriu lesão neurotóxica observada como degeneração walleriana no espaço sub-perineural próximo ao local da injeção.

Essa preocupação foi reforçada por GERNER et al. (2005) após a comprovação de lesão axonal e desmielinização proporcionais à demora no retorno da função nociceptiva após bloqueio com amitriptilina. Observaram lesões mais graves no rato que apresentou déficit clínico intenso durante 7 dias após o bloqueio do que no rato que apresentou maior recuperação da função nociceptiva após o sexto dia. Além disso, observaram que a degeneração walleriana foi maior no rato que não recuperou a sua função nociceptiva e que, além da degeneração walleriana, a injeção de amitriptilina sob a fáscia do nervo provocou infiltração macrofágica.

Apesar de SINNOTT; STRICHARTZ (2003) afirmarem que a eficácia do bloqueio e o potencial neurotóxico estão diretamente relacionados à dose da droga, o presente estudo considerou a hipótese de que a simples presença das microesferas sobre as fibras nervosas poderia ser prejudicial à função neuronal.

BRUMMETT et al. (2008) descrevem inflamação perineural 24 horas após a aplicação de BP em nervo ciático de ratos e, em algumas amostras, observaram grande número de linfócitos ao redor do nervo. No entanto, vale lembrar que o bloqueio foi realizado mediante a exposição cirúrgica do nervo ciático. Esse procedimento foi questionado por DYRE et al. (2006) quando observaram sinais de inflamação local em praticamente todos os animais sem relação com o anestésico, sugerindo que a inflamação foi causada pelo procedimento cirúrgico realizado para a exposição do nervo.

A possibilidade de reação inflamatória causada por procedimento cirúrgico foi afastada deste estudo considerando que a aplicação das microesferas e da LVBP livre foi por injeção transcutânea.

Apesar da inflamação perineural relatada por BRUMMETT et al. (2008), os axônios e a mielina não foram afetados. Quatorze dias após o bloqueio, nenhum sinal de inflamação foi observado.

Nenhuma alteração estrutural foi observada no presente estudo após a aplicação extraneural de microesferas contendo BP e LVBP em excesso enantiomérico de 50%. SONG et al. (2009) também não encontraram anormalidades quando investigavam os efeitos neurotóxicos da amitriptilina e da BP em nervo ciático de rato. As amostras que foram retiradas após 1, 3, 5 e 7 dias da aplicação das drogas foram analisadas sob MO e apresentavam epineuro e endoneuro intactos, fibras nervosas organizadas, poucas células inflamatórias e insignificante degeneração walleriana.

Considera-se que a capacidade lipofílica é a maior determinante da toxicidade anestésica local e a lesão neuronal é proporcional à dose aplicada no local da injeção (ZINK; GRAF, 2008). ZINK et al. (2003) atribuíram a miotoxicidade provocada pela BP administrada por cateter em nervo femoral de miniporcos à sua maior afinidade por lipídios que favorece o acúmulo no citoplasma.

PEREZ-CASTRO et al. (2009) desenvolveram estudo *in vitro* com células de neuroblastoma humano expostas a seis anestésicos locais mais utilizados na prática clínica (BP, ropivacaína, mepivacaína, lidocaína, procaína e cloroprocaína) e

comprovaram que a BP provocou morte celular em maior escala. Concluíram que a BP é capaz de induzir apoptose como resultado do aumento do tempo de exposição e do aumento da concentração da droga.

Considerando que a literatura apresenta poucos relatos de sintomas neurológicos pós-operatórios associados ao uso da BP, PEREZ-CASTRO et al. (2009) concluíram que a citotoxicidade nervosa induzida pelos AL pode ter mecanismos e neurônios-alvo diferentes.

KOHANE et al. (2003) aplicaram tetrodotoxina, um potente bloqueador dos canais de Na^+ , incorporada a microesferas contendo BP sobre nervo ciático de ratos e observaram um aumento de 6 vezes do tempo de duração do bloqueio fazendo-os suspeitar do efeito neurotóxico das drogas.

Um sistema de liberação prolongada de AL também pode servir para minimizar os efeitos neurotóxicos de quimioterápicos como a cisplatina. Seguindo esse raciocínio, UCHINO et al. (2005) administraram cisplatina pura e cisplatina incorporada a micelas poliméricas em ratos e camundongos. Os resultados indicaram que a cisplatina em micelas teve a sua atividade antitumoral preservada com redução da neurotoxicidade. Os sinais neurotoxicológicos provocados pela cisplatina livre foram alterações degenerativas manifestadas como: perda dos microtúbulos e neurofilamentos, degeneração do citoplasma das células de Schwann e lamela interna da mielina irregular em aproximadamente 80% dos nervos ciáticos analisados.

No entanto, os resultados obtidos no presente estudo não permitem afirmar que a liberação lenta da LVBP através das microesferas diminuiu seu efeito neurotóxico uma vez que a aplicação desse anestésico na sua forma livre sobre o SNP não provocou sinais de neurotoxicidade.

TAKENAMI et al. (2009) compararam o tempo de recuperação com a presença de sinais histológicos de neurotoxicidade analisados 4 dias após única injeção intratecal de BP e procaína em ratos Wistar. Os animais anestesiados com procaína apresentaram recuperação da capacidade motora mais rápida e nenhuma anormalidade histológica, enquanto os animais que receberam BP a 5% demoraram mais tempo para apresentar deambulação normal e a histopatologia revelou degeneração axonal da substância branca e raiz posterior.

Ao contrário desses achados, o presente estudo não revelou quaisquer sinais de neuropatia periférica provocados pela BP incorporada a microesferas assim como pela LVBP livre ou incorporada a microesferas.

Aparentemente, os ALs não causam dano direto ao nervo a não ser que sejam injetados intraneuralmente ou em altas concentrações. Além disso, doses locais de anestésicos são geralmente seguras ao paciente, entretanto, podem ser neurotóxicas quando há doença subclínica como é o caso do diabetes com neuropatia subclínica (HEBL, 2008).

De acordo com o estudo desenvolvido por SINNOTT; STRICHARTZ (2003), a LVBP a 0,25% produziu um bloqueio motor 30% maior comparado ao bloqueio conferido pela ropivacaína na mesma concentração. Tal diferença pode ocorrer em função da propriedade vasoativa da LVBP uma vez que a LVBP é mais vasoconstritora na pele do que a BP. No entanto, as alterações no fluxo sanguíneo em torno dos nervos periféricos não foram investigadas.

Os ALs empregados no presente estudo, livres ou incorporados às microesferas, bem como as próprias microesferas, não induziram alterações histológicas ou ultraestruturais nos nervos ciáticos avaliados. Nas imagens obtidas, as estruturas nervosas (fibras, células e espaço extracelular) não mostraram alterações: os axônios apresentaram distribuição homogênea de componentes do citoesqueleto (microtúbulos e microfilamentos) indicando que a difusão das moléculas ocorria normalmente. As células de Schwann não mostraram sinais de intoxicação que poderiam ser visualizados sob a forma de edema do citoplasma e rejeição das bainhas. Contudo, convém apontar que, segundo CAVANAGH (1991) as células de Schwann são elementos muito resistentes que se recuperam rapidamente de uma agressão, independentemente do agente agressor. Os ratos eutanasiados nos tempos estudados (2º, 4º, 6º e 8º dia pós-injeção) não apresentaram alteração dessas células.

As bainhas de mielina apresentaram aspecto normal com eventuais deformidades explicadas como decorrentes de artefato de processamento. O sistema nervoso periférico, embora com características diferentes do sistema nervoso central (notadamente pela presença de matriz extracelular colagênica no primeiro), é um tecido delicado. Isto significa que a manipulação pode induzir artefatos nas bainhas e nos fascículos, o que dificulta a interpretação das imagens (SUMMERS et al., 1995).

Em vários cortes semifinos e ultrafinos foram visualizados fibroblastos e feixes de fibras colágenas, o que caracteriza a morfologia normal do nervo. Também foram observados ocasionais mastócitos repletos de grânulos. CAVANAGH (1991) frisa que em qualquer tipo de agressão aos nervos periféricos, os mastócitos proliferam, sem que se conheça ainda a real causa dessa proliferação e a função que ela desempenharia. Nos cortes analisados, não foi detectada proliferação dessas células.

O resultado histopatológico pode ser comprovado pelo estado clínico dos animais uma vez que a presença de degeneração walleriana intensa pode produzir hiperalgesia e nenhum dos animais apresentou comportamento alterado durante o experimento. Esse resultado é contrário ao apresentado por ESTEBE e MYERS (2004) que observaram hiperalgesia e comportamento alodínico dos ratos que receberam 5 mg de amitriptilina.

Em nenhum dos cortes foi observada a presença de células inflamatórias que seriam abundantes no caso de lesão aos axônios ou à mielina (SANCHEZ et al., 2006). A ausência de alterações observáveis na ultraestrutura até o 8º dia pós-injeção sugere que não haverá alterações quando da aplicação a longo prazo dos mesmos anestésicos.

No entanto, de acordo com LE CORRE et al. (1997), os resultados obtidos com uma droga devem ser cuidadosamente extrapolados para outra mesmo que sejam estruturalmente semelhantes. Além disso, múltiplos fatores interferem na liberação do AL pela microesfera polimérica como a natureza e o peso molecular do polímero.

A administração de AL em sistemas de liberação controlada pode ser útil no tratamento de diversos tipos de dor e dispensa o uso de sofisticadas técnicas de cateterização ou bombas de infusão. No entanto, há muito que se estudar para encontrar uma maneira de regular a taxa de liberação dos AL através das microesferas para assegurar que a quantidade desejada da droga seja liberada.

5.7 POSSIBILIDADE DE FALHA TÉCNICA E INJEÇÃO INTRANEURAL

Poucas informações são encontradas na literatura sobre como reconhecer ou evitar uma injeção intraneural. Apesar de ser o sinal cardinal de uma injeção

intraneural, a dor não pode ser considerada como único sinal de lesão neuronal (ENNEKING et al., 2005).

Em um estudo experimental em coelhos, SELANDER et al. (1985) identificaram evidências histológicas de lesão neuronal como resultado da pressão de injeção intrafascicular.

No entanto, de acordo com NEAL et al. (2002), o contato da agulha com o nervo sem a injeção de AL raramente produz anormalidades funcionais ou clínicas. Essa observação indica que é o efeito combinado da penetração da agulha com a injeção do AL no fascículo neural que causa degeneração axonal e subsequente injúria neurológica.

Considerando que um dos sinais da injeção intraneural acidental é a resistência à introdução da agulha ou aumento da pressão necessária para a injeção do AL, é possível afastar a hipótese de ter ocorrido esse tipo de falha técnica no presente experimento uma vez que o anestesta não relatou tais ocorrências. Além disso, nenhuma amostra desse estudo apresentou evidências de degeneração walleriana das fibras dentro dos fascículos ou do perineuro. De acordo com HADZIC et al. (2004), apenas injeções com alta pressão causariam déficit neurológico detectável e alterações histológicas da lesão aos fascículos.

Para ENNEKING et al. (2005), a ocorrência de falhas nas técnicas de bloqueio regional pode ser reduzida por mecanismos de imagem que possibilitam a visualização das estruturas a serem anestesiadas.

Contrário à suposição de que a anestesia regional guiada por ultrassom seja capaz de evitar lesão neurológica, HEBL (2008) ressalta que essa técnica não é capaz de eliminar todos os fatores de risco relacionados à injúria transoperatória. Para ele, os riscos da anestesia regional incluem: trauma mecânico pela agulha ou cateter, isquemia neural secundária à vasoconstrição ou edema neural, e toxicidade do anestésico local.

5.8 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

O objetivo da histomorfometria foi mensurar possíveis alterações do diâmetro dos axônios considerando que o início do processo de degeneração walleriana provoca edema inicial e posterior desintegração axonal.

A análise histomorfométrica dos axônios revelou uma tendência à diferença significativa entre os grupos LL e M em função da dificuldade encontrada para obter cortes transversais homogêneos dos axônios (visível nas imagens selecionadas). Pode-se observar que, em alguns cortes semifinos, a orientação axonal foi oblíqua, o que levou a uma distorção no resultado das medições. Uma maneira de minimizar as consequências de uma análise tendenciosa devido às diferentes apresentações dos axônios seria o estudo individual da relação diâmetro do axônio/espessura da bainha de mielina.

6 CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, a aplicação aguda de microesferas com bupivacaína e levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% sobre nervo ciático de ratos Wistar não apresentou efeitos deletérios aos nervos. Da mesma forma, as microesferas puras e a levobupivacaína livre não provocaram alterações ultraestruturais dos nervos estudados.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D.R.; PINTO, L.M.; BRAGA, A.F.A. Formulações de anestésicos locais de liberação prolongada: Aplicações terapêuticas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 53, p. 663-671, 2003.
- ARAÚJO, D.R.; FRACETO, L.F.; BRAGA, A.F.A. Sistemas de liberação controlada com bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25): Efeitos da complexação com ciclodextrinas no bloqueio do nervo ciático em camundongos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 316-328, 2005.
- ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. Ratos. In: **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação**. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. p. 82, 2004.
- BIBBY, D.; DAVIES, N.M.; TUCKER, I.G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 197, p. 1-11, 2000.
- BLANCO, M.D.; BERNARDO, M.V.; GOMEZ, C. Bupivacaine-loaded comatrix formed by albumin microspheres included in a poly(lactide-co-glycolide) film: in vivo biocompatibility and drug release studies. **Biomaterials**, Guilford, v. 20, p. 1919-1924, 1999.
- BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; SINHORINI, I.L.; GRACA, D.L. Schwann cells may express an oligodendrocyte-like remyelinating pattern following ethidium bromide injection in the rat brainstem. **Acta Microscópica**, Rio de Janeiro, v. 8, Supl. C, p. 707-708, 1999.
- BOOGAERTS, J.G.; LAFONT, N.D.; DECLERQ, A.G. Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. **Journal of Clinical Anesthesia**, Stoneham, v. 6, p. 315-320, 1994.
- BORGEAT, A.; EKATODRAMIS, G.; SCHENKER, C.A. Postoperative nausea and vomiting in regional anesthesia. A review. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 98, p. 530-547, 2003.
- BRUMMETT, C.M.; NORAT, M.A.; PALMISANO, J.M.; LYDIC, R. Perineural administration of dexmedetomidine in combination with bupivacaine enhances sensory and motor blockade in sciatic nerve block without inducing neurotoxicity in the rat. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 109, n. 3, p. 502-511, 2008.
- CAVANAGH, J.B. Reactions of neurons and Schwann cells to injury. In: WELLER, R.O.; **Nervous System, Muscle and Eyes**. 3^a ed. 1990. Edinburgh: Churchill Livingstone. Cap. 19. p. 533-543.

CURLEY, J.; CASTILLO, J.; HOTZ, J. Prolonged regional nerve block. Injectable biodegradable bupivacaine – polyester microspheres. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 84, p. 1401-1410, 1996.

DALMORA, M.E.; DALMORA, S.L.; OLIVEIRA, A.G. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 222, p. 45-55, 2001.

DE JONG, R.H. **Local Anesthetics**. Philadelphia: Mosby-Year Book, 1997.

DYHRE, H.; SÖDERBERG, L.; BJÖRKMAN, S; CARLSSON, C. Local Anesthetics in Lipid-depot formulations – Neurotoxicity in relation to duration of effect in a rat model. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Philadelphia, v. 31, p. 401-408, 2006.

ESTEBE, J.P.; GENTILI, M.E.; LE CORRE, P.; LEDUC, C.; MOULINOX, J.P.; ECOFFEY, C. Contralateral effect of amitriptyline and bupivacaine for sciatic nerve block in an animal model of inflammation. **British Journal of Anesthesia**, London, v. 95, p. 705-709, 2004.

ESTEBE, J.P.; MYERS, R.R. Amitriptyline Neurotoxicity. Dose-related pathology after topical application to rat sciatic nerve. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 100, n. 6, p. 1519-1525, 2004.

FLETCHER, D.; LE CORRE, P.; GUILBAUD, G. Antinociceptive effect of bupivacaine encapsulated in poly(D,L)- lactide-co-glycolide microspheres in the acute inflammatory pain model of carrageenin-injected rats. **Anesthesia & Analgesia**, Baltimore, v. 84, p. 90-94, 1997.

FROMMING, K.H.; SZEJTLI, J. CD Complexes in Solution. In: _____. **Cyclodextrins in Pharmacy. Topics in Inclusion Science**. Hungria: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 50-51.

GERNER, P.; LOU, S.H.; ZHUANG, Z.; DJALALI, A.G. ; ZIZZA, A.M. ; MYERS, R.R. ; WANG, G.K. Differential block of N-propyl derivatives of amitriptyline and doxepin for sciatic nerve block in rats. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Philadelphia, v. 30, p. 344-350, 2005.

GRANT, G.J.; BARENHOLZ, Y.; PISKOUN, B. DRV liposomal bupivacaine: preparation, characterization and in vivo evaluation in mice. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 336-343, 2001.

GRANT, G.L.; BANSINATH, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Philadelphia, v. 26, p. 61-63, 2001.

International Association for the Study of Pain. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org>> Acesso em: 06 agosto. 2007.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 86, p. 147-162, 1997.

JOHNSON, M.E.; SAENZ, A.; DaSILVA, A.D.; UHL, C.B.; GORES, G.J. Effect of local anesthetic on neuronal cytoplasmic calcium and plasma membrane lysis (necrosis) in a cell culture model. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 97, n. 6, p. 1466-1476, 2002.

KALICHMAN, M.W. Physiologic mechanisms by which local anesthetics may cause injury to nerve and spinal cord. **Regional Anesthesia**, San Diego, v. 18, p. 448-452, 1993.

KALICHMAN, M.W.; MOORHOUSE, D.F.; POWELL, H.C.; MYERS, R.R. Relative neural toxicity of local anesthetics. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, Baltimore, v. 52, n. 3, p. 234-240, 1993.

KOHANE, D.S.; JAMIE, Y.; LU, N.T. ; LANGER, R. ; STRICHARTZ, G.R. ; BERDE, C.B. A re-examination of tetrodotoxin for prolonged duration local anesthesia. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 89, n. 1, p. 119-131, 1998.

LAFONT, N.D.; LEGROS, F.D.; BOOGAERTS, J.G. Use of liposome- associated bupivacaine in a cancer pain syndrome. **Anaesthesia**, London, v. 51, p. 578-579, 1996.

LANGERMAN, L.; GRANT, G.J.; ZAKOWSKI, M. Prolongation of epidural anesthesia using a lipid carrier with procaine, lidocaine and tetracaine. **Anesthesia & Analgesia**, Baltimore, v. 75, p. 900-905, 1992.

LE CORRE, P.; LE GUEVELLO, P.; GAJAN, V. Preparation and characterization of bupivacaine-loaded polylactide and polylactide-co-glycolide microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 107, p. 41-49, 1994.

LE CORRE, P.; RYTTING, J.H.; GAJAN, V.; CHEVANNE, F.; LE VERGE, R. *In vitro* controlled release kinetics of local anaesthetics from poly(D, L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, n. 2, p. 243-255, 1997.

LEE, T.K.; SOKOLOSKY, J.D.; ROYER, J.P. Serum albumin beads: an injectable, biodegradable system for the sustained release of drugs. **Science**, Washington DC, v. 213, p. 233 – 235, 1981.

LIENTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. Liposomes – Preparation, characterization and preservation. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 33, p. 337-462, 1988.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 225, p. 15-30, 2001.

MATEU, L.; LUZZATI, V.; VILLEGAS, G. M.; BORGO, M.; VARGAS, R. Order-disorder phenomena in myelinated nerve sheaths. IV. The disordering effects of high levels of local anesthetics on rat sciatic and optic nerves. **Journal of Molecular Biology**, England, v. 226, n. 2, p. 535-545, 1992.

MATHER, L.E.; CHANG, D.H. Cardiotoxicity with modern local anesthetics: is there a safer choice? **Drugs**, Auckland, v. 61, p. 333-342, 2001.

MATHIOWITZ, E.; SALTZMAN, W.M.; DOMB, A.; DOR, P.; LANGER, R. Polyanhydride microspheres as drugs carriers. II. Microencapsulation by solvent removal. **Journal of Biomedical Materials Research**, Massachusetts, v. 35, n. 3, p. 755-774, 1988.

MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, agricultura, biotecnologia, química e produtos gerais**. 1ª ed. Maringá, Eduem, 3-5. 2000.

MILLS, B.J.; ALLEN, A.M.; GERRITY, L.W.; KNAPKA, J.J. et al. Criteria for Selecting Experimental Animals. In: _____. **Laboratory Animal Management. Rodents**. National Academy Press, Washington. p. 17. 1996.

MRAK, R.E. The big eye in the 21st century: The role of electrón microscopy in modern diagnostic neuropathology. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, Baltimore, v. 61, p. 1027-1039, 2002.

MULROY, M.F.; LARKIN, K.L.; BATRA, M.S. Femoral nerve block with 0,25% or 0,5% bupivacaine improves postoperative analgesia following outpatient arthroscopy anterior cruciate ligament repair. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Philadelphia, v. 26, p. 24-29, 2001.

MURAUSKI, J.D.; GONZALEZ, K.R. Peripheral nerve blocks for postoperative analgesia. **AORN Journal**, New York, v. 75, p. 136-147, 2002.

NEAL, J.M.; HEBL, J.R.; GERANCHER, J.C. Brachial plexus anesthesia: Essentials of our current understanding. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Philadelphia, v. 27, p. 402-428, 2002.

PEREZ-CASTRO, R.; PATEL, S.; GARAVITO-AGUILAR, Z.V.; ROSENBERG, A.; RECIO-PINTO, E.; ZHANG, J.; BLANCK, T.J.; XU, F. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. **Anesthesia & Analgesia**, Baltimore, v. 108, n. 3, p. 997-1007, 2009.

RAMOS, A.T. **O modelo desmielinizante do brometo de etídio: estudos morfológicos em camundongos C57BL/6 normais e knockout para conexina 32**. 151 f. Tese (Doutorado em Patologia Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

RANADE, V.V. Drug delivery systems. Site-specific drug delivery using lipossomas as carriers. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 685-694, 1989.

ROSE, J.S.; NEAL, J.M.; KOPACZ, D.J. Extended-Duration Analgesia: Update on Microspheres and Liposomes. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Philadelphia, v.30, p. 275-285, 2005.

SAEZ, V.; HERNÁEZ, E.; ANGULO, L.S.; KATIME, I. Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 5, n. 2, p. 87 – 101, 2004.

SANCHEZ M.; BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; SINHORINI, I.L.; DAGLI, M.L.Z.; MAIORKA, P.C.; PEREIRA, L.A.V.; GRAÇA, D.L. Marcação imuno-histoquímica da resposta macrofágica e astrocitária no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio e tratados com ciclofosfamida. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.64, n.3, p.787-793, 2006

SIDDALL, P.J.; COUSINS, M.J. Pain mechanisms and management: an update. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Oxford, v. 22, p. 679-688, 1995.

SIMONETTI, M.P.B.; VALINETTI, E.A.; FERREIRA, F.M.C. Evaluation of the local anesthetic activity of S(-) bupivacaine: experimental study *in vivo* in the rat sciatic nerve. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 5, p. 425-434, 1997.

SONG, L.; XIAO, H.; YANG, F.; YANG, B.; KANG, X. ; WEN, C. ; LIU, H. Peripheral anti-hyperalgesic effect and neurotoxicologic screening of amitriptyline and bupivacaine on sciatic nerve blockade chronically on neuropathic pain in rats. **Zhongguo xiufu chongjian waike zazhi - Chinese journal of reparative and reconstructive surgery**, China, v. 23, n. 7, p. 827-831, 2009. Disponível em: <<http://www.scimagojr.com>>. Acesso em: 18/01/2010.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS J.F.; de LAHUNTA, A. Diseases of the peripheral nervous system. In: _____. **Veterinary Pathology**. Cap. 7, p. 402-501, 1995.

TAKENAMI, T.; YAGISHITA, S.; NARA, Y.; TSAI, Y.H.; HIRUMA, H.; KAWAKAMI, T.; HOKA, S. Spinal procaine is less neurotoxic than mepivacaine, prilocaine and bupivacaine in rats. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Philadelphia, v.34, n. 3, p. 189-195, 2009.

TANAKA, P.P.; ESTEBE, J.P.; CAMPOS, R.; CHEVANNE, F.; LE CORRE, P.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, M.F. Preparation, characterization and *in vitro* evaluation of 50% enantiomeric excess bupivacaine (S75-R25)-loaded microspheres. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 1, p. 15-22, 2008.

TORRES, M.F. **Reparação microcirúrgica de nervo periférico por meio de sutura, cola de fibrina ou bainha de BioFill® em ratos Wistar**. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

UCHINO, H.; MATSUMURA, Y.; NEGISHI, T.; KOIZUMI, F.; HAYASHI, T.; HONDA, T.; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K.; NAITO, S.; KAKIZOE, T. Cisplatin-incorporating

polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. **British Journal of Cancer**, London, v. 93, p. 678-687, 2005.

UDELSMANN, A.; LORENA, S.E.R.S.; GIRIOLI, S.U.; SILVA, W.A.; MORAES, A.C. Efeitos hemodinâmicos da intoxicação aguda com bupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50%. Estudo experimental em suínos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 1, p. 63 – 72, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de bibliotecas. **Teses, dissertações, monografias e trabalhos acadêmicos**. Curitiba: Editora UFPR, 2007 (Normas para apresentação de documentos científicos 2).

ZINK, W.; SEIF, C.; BOHL, J.R.E.; HACKE, N.; BRAUN, P.M.; SINNER, B.; MARTIN, E.; FINK, R.H.A.; GRAF, B.M. The acute myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockades. **Anesthesia & Analgesia**, Baltimore, v. 97, p. 1173-1179, 2003.

ZINK, W.; GRAF, B.M. The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine. **Current Opinion in Anaesthesiology**, London. v. 21, n. 5, p. 645-650, 2008.